



Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des endothélines, ETAR et ETBR, surexprimés dans de nombreux cancers et impliqués dans la progression tumorale

Aurélie Borrull

► To cite this version:

Aurélie Borrull. Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des endothélines, ETAR et ETBR, surexprimés dans de nombreux cancers et impliqués dans la progression tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114820 . tel-01337324

HAL Id: tel-01337324

<https://theses.hal.science/tel-01337324>

Submitted on 25 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ
PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2011 - 2015

SÉRIE DOCTORAT N° 1332

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 24/06/2015

par

Aurélie BORRULL

**Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux
dirigés contre les récepteurs des endothélines,
ET_AR et ET_BR, surexprimés dans de nombreux cancers
et impliqués dans la progression tumorale.**

Co-directeurs de thèse :

Jean-Yves COURAUD
Philippe ROBIN

PU (Univ. Paris 7 - CEA)
MCU (Univ. Paris 11 - CEA)

Composition du jury :

Président du jury :

Marc PALLARDY

PU (Univ. Paris 11)

Rapporteurs :

Ralf JOCKERS

DR (Institut Cochin)

Marie-Alix POUL

PU (IRCM)

Examineur :

Frédérique DESHAYES

MCU (IJM - Univ. Paris 7)

ATTENTION

Ce manuscrit de thèse est strictement confidentiel. Son contenu est la propriété du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives.

Merci de ne pas diffuser ou communiquer à des tiers.

A ma sœur

A ma fille

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé dans le Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé, au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives de Saclay, ainsi que dans le laboratoire de Signalisation Moléculaire et Cellulaire Utérine de l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire.

Je souhaiterais avant tout remercier les membres du jury qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie plus particulièrement le Pr Marie-Alix POUL et le Dr Ralf JOCKERS qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Dr Frédérique DESHAYES et le Pr Marc PALLARDY qui ont accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements s'adressent à mes deux directeurs de thèse, le Pr Jean-Yves COURAUD et le Dr Philippe ROBIN. Jean-Yves, je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de postuler à un financement MESR pour travailler sur ce sujet de thèse. Merci également de m'avoir guidée dans mes recherches. Philippe, merci beaucoup d'avoir accepté de prendre la co-direction de ma thèse et pour ton investissement dans cette tâche : merci pour ta disponibilité (malgré toutes tes obligations à l'Université), tes idées, tes conseils, ton œil critique, ta gentillesse et pour tout le temps que tu as consacré à la correction de ce manuscrit.

Je remercie le Dr Frédéric DUCANCEL pour son accueil au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé.

Je tiens à remercier les membres de l'Ecole Doctorale 425, Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué, pour leur implication et le rôle crucial qu'ils ont tenu dans le bon déroulement de cette thèse. Plus particulièrement, merci au Pr Marc PALLARDY, au titre de directeur de l'ED 425, au Pr Catherine DUBERNET, au titre de directrice-adjointe, et au Dr Karl BALABANIAN, au titre de responsable du pôle Immunologie et Biothérapies.

J'adresse mes remerciements au chef de service du SPI, le Dr Christophe CREMINON pour son engagement afin que ma thèse puisse arriver à son terme et pour les conditions de travail dont j'ai bénéficié au bâtiment 136. Merci également à toute l'équipe administrative, Sandrine, Laurie et Stéphane.

Un immense merci à Anne et Emmanuelle : merci à vous deux d'avoir toujours été disponibles (pour le *vivo*, la culture, la cytométrie...) que ce soit pour me former ou me donner un coup de main. Surtout, merci pour votre soutien et votre amitié durant ces longues années de thèse.

Laeti, merci à toi aussi pour ton amitié et pour les longues secondes que tu as passé à rigoler quand j'essayais de remonter une pipette...

Merci à toutes les personnes du deuxième étage du 136 pour leur sympathie, leur soutien et leur aide tout au long de cette thèse : Hervé V (pour toutes les discussions que nous avons pu avoir), Stéphanie (pour m'avoir trouvé un bureau), Marie-Claire

(pour le traceur et l'Ellman), Nathalie, Cécile, Céline, Boubou (pour les purifications), Julie, Sophie V (qui m'a un peu tenu compagnie en culture), Elise (pour les gels), Jérôme (pour le pepscan), KAP (pour le GUAVA), Stéphane, Hervé (pour toutes les discussions pepscan), Marie, Sandrine, Blanche, Sophie W, Michel et Alexandra (pour la pipette pour la fusion). Tout particulièrement, merci à l'équipe des monoclonaux, Patricia, Karine et Marc, pour leur aide et sans qui les hybridomes n'auraient pas vu le jour.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Zahra TANFIN pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour ma dernière année de thèse. Pour la façon dont tout le monde au labo a tous les jours travaillé dans la bonne humeur, l'entraide et l'efficacité, Zahra, je te suis infiniment reconnaissante. Je te remercie également pour ton aide dans la rédaction du manuscrit.

Je remercie très chaleureusement les membres du club café, Marie(-Hélène), Steph, Sandrine, Denis et Faïza. Vous rendez les journées toutes plus agréables ! Marie, Steph et Sandrine, merci pour votre disponibilité et votre bonne humeur. Denis, merci beaucoup pour les manips PLC.

Cette thèse a été une épreuve, tant sur un plan professionnel que personnel, au cours de laquelle j'ai pu compter sur mes proches. Un immense merci à mes parents, mon frère, mais aussi à ma sœur, qui tenait à être là le jour de ma soutenance. Merci également à tout ceux que je ne mentionne pas et qui m'ont aidé à continuer. Enfin je remercie David, mon mari, pour sa présence à mes côtés, et mon merveilleux petit rayon de soleil, ma fille, Pénélope.

RESUME

Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des endothélines, ET_AR et ET_BR, surexprimés dans de nombreux cancers et impliqués dans la progression tumorale.

Il est admis que l'axe endothéline (endothélines ET-1, -2 et -3 et leurs RCPG ET_AR et ET_BR), participe à la progression tumorale. Alors qu'ET_AR est par exemple surexprimé dans le cancer de l'ovaire, ET_BR l'est dans le mélanome. Cette surexpression, ainsi que l'implication d'ET_{A/B}R dans la carcinogenèse, font de ces RCPG une cible tumorale pertinente. En raison de leurs forte spécificité, actions cytotoxiques variées, possibilités de couplage, les anticorps monoclonaux (AcM) sont des outils de choix en diagnostic et thérapie anti-cancéreuse. Cependant, on déplore actuellement l'absence d'AcM ciblant des RCPG sur le marché. Par une technique d'immunisation génique, 4 AcM anti-ET_AR et 24 anti-ET_BR ont été produits. Les résultats préliminaires obtenus avec les anti-ET_AR sont prometteurs puisque ces AcM lient avec une haute affinité ET_AR surexprimé dans des cellules CHO, l'un d'eux inhibant fortement la liaison du ligand. Mon travail de thèse s'est cependant concentré sur la caractérisation d'un anti-ET_BR, le rendomab-B4. Il reconnaît de façon spécifique et avec une forte affinité la conformation native d'ET_BR surexprimé à la surface de cellules de mélanomes, suggérant l'existence d'une forme tumorale du récepteur. Suite à sa liaison aux cellules UACC-257 (lignée de mélanome), l'AcM se trouve internalisé. Dans ces cellules, le rendomab-B4, malgré son incapacité à inhiber la liaison de l'ET, inhibe l'activation de la voie PLC induite par le ligand et est également un fort inhibiteur de la migration due à l'activation de l'axe endothéline. Ces travaux soulignent l'intérêt du rendomab-B4 comme outil diagnostique et thérapeutique dans le cas du mélanome.

Mots clés : axe endothéline, RCPG, cancer, anticorps monoclonaux

ABSTRACT

Production and characterization of monoclonal antibodies targeting endothelin receptors, ET_AR and ET_BR, overexpressed in many cancers and implicated in tumor progression.

It has been admitted that endothelin axis (endothelins ET-1, -2 and -3 and related GPCRs ET_AR and ET_BR) is involved in tumor progression. For instance, while ET_AR is overexpressed in ovarian cancer, ET_BR is in melanoma. This overexpression, as well as ET_{A/B}R involvement in carcinogenesis, make these GPCRs a relevant tumor target. Because of their high specificity, various cytotoxic actions, possibilities of coupling, the monoclonal antibodies (mAbs) are useful tools in diagnosis and anti-cancer therapy. However, the absence of mAbs targeting GPCRs on the market is regrettable. Thanks to DNA immunization, 4 anti-ET_AR mAbs and 24 anti-ET_BR mAbs were produced. Preliminary results obtained with anti-ET_AR are promising since these mAbs bind ET_AR overexpressed in CHO cells with high affinity, one of them being a potent inhibitor of ligand binding. However, the aim of my PhD research works focused on the characterization of one anti-ET_BR, rendomab-B4. It specifically recognizes with high affinity the native conformation of ET_BR overexpressed on the surface of melanoma cells, suggesting the existence of a tumor-specific receptor. Following its binding on UACC-257 cells (melanoma cell line), the mAb is internalized. In these cells, rendomab-B4, despite its inability to inhibit ET binding, is able to inhibit the ligand-induced activation of PLC pathway and display a potent inhibition of endothelin axis-induced migration. This work highlights the interest of rendomab-B4 as a tool for diagnosis and therapy in melanoma.

Key words: endothelin axis, GPCR, cancer, monoclonal antibodies

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	4
RESUME	6
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIERES.....	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	19
A. Le système endothéline	19
1. Les endothélines.....	19
1. 1. Découverte de l'endothéline	19
1. 2. Structure des endothélines.....	19
1. 3. Biodistribution des endothélines.....	20
1. 4. La biosynthèse des endothélines	22
1. 5. Régulation de la biosynthèse et de la libération des endothélines.....	24
1. 6. Dégradation et clairance de l'endothéline	25
2. Les récepteurs des endothélines	26
2. 1. Découverte et structure des récepteurs des endothélines.....	26
2. 2. Biodistribution d'ET _A R et d'ET _B R.....	29
2. 3. Modifications post-traductionnelles des récepteurs des endothélines.....	29
2. 4. Dimérisation des récepteurs des endothélines.....	30
3. Signalisation de l'axe endothéline	32
3. 1. Voies de signalisation associées à l'axe endothéline	32
3. 2. Internalisation et désensibilisation des récepteurs des endothélines.....	40
4. Rôles physiologiques et physiopathologiques de l'axe endothéline	43
4. 1. Rôle de l'axe endothéline dans le tonus vasculaire.....	43
4. 2. Rôle de l'axe endothéline dans le muscle cardiaque.....	47
4. 3. Rôle de l'axe endothéline dans les voies respiratoires	49
4. 4. Rôle de l'axe endothéline dans l'homéostasie rénale	49
4. 5. Rôle de l'axe endothéline dans l'embryogénèse	50
4. 6. Rôle de l'axe endothéline dans d'autres organes	51
5. Les récepteurs aux endothélines, cibles pharmacologiques	52
B L'axe endothéline dans la carcinogénèse	53
1. Expression de l'axe endothéline dans les cancers.....	53
2. Implication de l'axe endothéline dans la progression tumorale	56
2. 1. Prolifération.....	57
2. 2. Survie.....	58
2. 3. Migration et invasion	59
2. 4. Transition épithélio-mésenchymateuse et cellules souches tumorales	61

2. 5. Métastase	62
2. 6. Angiogenèse et lymphangiogenèse.....	63
2. 7. Inflammation et système immunitaire	65
2. 8. Ostéogenèse.....	67
2. 9. Douleur	69
3. L'axe endothéline, cible de la thérapie anticancéreuse	71
3. 1. Impact des modulateurs pharmacologiques de l'axe endothéline sur la progression tumorale.....	71
3. 2. Essais cliniques autour de l'axe endothéline dans le cancer	73
C. Immunothérapie anti-cancéreuse.....	76
1. Les traitements contre le cancer	76
1. 1. Les traitements de routine	76
1. 2. L'immunothérapie dans le traitement des cancers.....	79
2. Généralités sur les anticorps	83
2. 1. Les anticorps en quelques dates	83
2. 2. Structure des anticorps.....	84
2. 3. Les différentes classes d'anticorps.....	86
2. 4. Interaction de l'anticorps avec son antigène	88
3. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique	90
3. 1. Des débuts de la sérothérapie au développement des anticorps monoclonaux	90
3. 2. De l'anticorps murin à l'anticorps humain.....	91
4. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux utilisés en oncologie	94
4. 1. Pharmacocinétique, pharmacodynamique et biodistribution.....	95
4. 2. Effets dépendants du fragment Fab.....	96
4. 3. Effets dépendants du fragment Fc.....	98
5. Ingénierie des anticorps thérapeutiques en oncologie	102
6. Anticorps monoclonaux thérapeutiques	107
6. 1. Les anticorps monoclonaux en oncologie	107
6. 2. Limitations toxiques des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	112
6. 3. Les récepteurs des endothélines : futures cibles des AcM en oncologie ? ..	115
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	117
PARTIE RESULTATS ET_AR.....	118
A. Implication de l'axe ET-1/ET_AR dans la carcinogenèse, exemple des cancers de l'ovaire et de la prostate	118
1. Axe ET-1/ET _A R et progression tumorale	118
2. Cancers de l'ovaire et de la prostate : deux enjeux de santé publique	119
3. Axe ET-1/ET _A R et cancer de l'ovaire	120
4. Axe ET-1/ET _A R et cancer de la prostate	120
5. La thérapie : les traitements actuels, leurs limites et les nouvelles cibles moléculaires	121
B. Stratégie d'obtention des anticorps anti-ET_AR et protocoles.....	123
1. Production des anticorps polyclonaux anti-ET_AR	123
1. 1. Mise en place et caractérisation des outils cellulaires	123
1. 2. Le concept de l'immunisation génique couplée à l'électrotransfert	129

1. 3. Protocole d'immunisation génique	132
2. Production des anticorps monoclonaux anti-ET_AR.....	133
2. 1. Choix des souris	133
2. 2. Mise au point du test de criblage des hybridomes	136
2. 3. Obtention des anticorps anti-ET _A R par fusion cellulaire	138
C. Caractérisation des anticorps monoclonaux anti-ET_AR	143
1. Les anti-ET _A R reconnaissent spécifiquement le récepteur A humain des endothélines	143
2. Un des anti-ET _A R inhibe la liaison de l'endothéline à ET _A R.....	147
D. Perspectives.....	149
PARTIE RESULTATS ET_BR.....	151
A. Le mélanome.....	151
1. Epidémiologie du mélanome	151
2. Types de mélanomes.....	151
3. Facteurs de risque du mélanome	152
4. Progression du mélanome	153
5. Les différents stades de développement du mélanome	155
6. Physiopathologie.....	156
6. 1. Développement des mélanocytes et axe endothéline	157
6. 2. Etiologie du mélanome	158
7. Les traitements du mélanome	160
B. Choix d'un AcM ciblant ET_BR : du rendomab-B1 au rendomab-B4	165
C. ARTICLE	167
D. Conclusion et perspectives de l'article du rendomab-B4.....	202
DISCUSSION GENERALE – CONCLUSION	207
BIBLIOGRAPHIE	215
ANNEXES	247

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Structure des endothélines et des sarafotoxines.....	20
Figure 2. Expression des endothélines.	21
Figure 3. Biosynthèse de l'endothéline-1.....	23
Figure 4. Régulation du promoteur d' <i>edn-1</i>	25
Figure 5. Structure du récepteur ET _B humain	27
Figure 6. Expression des récepteurs des ET.....	29
Figure 7. Résumé des différents dimères formés par ET _A R et ET _B R.....	32
Figure 8. Signalisation de l'axe endothéline.	34
Figure 9. Voies MAPK activées par ET-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires.	36
Figure 10. Activation de la voie ERK1/2.....	38
Figure 11. Régulation de l'endocytose d'un RCPG médiée par l'arrestine.	42
Figure 12. Principaux rôles physiologiques et pathologiques de l'ET-1.....	45
Figure 13. Régulation du tonus vasculaire par l'axe endothéline.....	47
Figure 14. Expression des récepteurs des ET dans les cancers.....	56
Figure 15. Rôle de l'axe endothéline dans l'immunomodulation du cancer.	68
Figure 16. Antagonistes des récepteurs des ET utilisés en phases cliniques II et III en thérapie anticancéreuse.	75
Figure 17. Structure schématique d'une immunoglobuline G.....	85
Figure 18. Structure des différentes classes d'anticorps.....	87
Figure 19. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes classes d'immunoglobulines.....	88
Figure 20. Différentes générations d'anticorps thérapeutiques.	92
Figure 21. Mécanismes effecteurs des anticorps monoclonaux.	100
Figure 22. Représentation schématique de différents formats d'anticorps.....	104
Figure 23. Anticorps couplés.....	105
Figure 24. Anticorps monoclonaux utilisés en oncologie.	109
Figure 25. Implication de l'axe ET-1/ET _A R dans la progression tumorale.	119
Figure 26. Liaison spécifique et saturation à l'équilibre de l'ET1-FAM sur ET _A R exprimé à la surface de cellules CHO.....	124
Figure 27. Expression transitoire d'ET _A R et d'ET _B R dans des HEK-293-T.....	126
Figure 28. Cinétique d'activation de ERK1/2 et de FAK en réponse à l'ET-1 dans les CHO-ET _A R.....	127
Figure 29. Modèle d'induction de la réponse immunitaire lors de l'immunisation génique.....	131
Figure 30. Schéma du protocole d'immunisation génique anti-ET _A R.....	133

Figure 31. Suivi de la réponse humorale polyclonale spécifique d'ET _A R, chez les Balb/c, au cours du protocole d'immunisation génique.....	135
Figure 32. Réponse humorale polyclonale testée en ELISA sur cellules.....	137
Figure 33. Schéma du protocole d'obtention des anticorps monoclonaux.....	139
Figure 34. Premier criblage par ELISA sur cellules après fusion.	141
Figure 35. Criblage des puits de fusion positifs par cytométrie en flux.....	142
Figure 36. Isotypes des 4 anticorps anti-ET _A R obtenus.	143
Figure 37. Liaison spécifique du mAb-A1 sur ET _A R à la surface de cellules CHO.	144
Figure 38. Etude de la liaison à l'équilibre des anticorps monoclonaux anti-ET _A R.	145
Figure 39. Spécificité de liaison des anticorps anti-ET _A R humain.	146
Figure 40. Compétition de l'ET-1-FAM avec le mAb-A1 pour la liaison sur CHO-ET _A R.....	148
Figure 41. Effet des AcM anti-ET _A R sur l'activation de ERK1/2 par ET-1.	150
Figure 42. Modèle de développement linéaire du mélanome (modèle de Clark).....	154
Figure 43. Modèles de progression du mélanome.	155
Figure 44. Classification de l'AJCC.....	156
Figure 45. Schéma représentatif de la structure épidermique.	157
Figure 46. Stratégies thérapeutiques adoptées en fonction du stade du mélanome.....	161
Figure 47. Inhibiteurs des voies de signalisation utilisés dans le traitement du mélanome et leurs cibles d'action.	162
Figure 48. Voies de signalisation PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK et mécanismes d'action de leurs inhibiteurs dans le mélanome.	162
Figure 49. Mécanisme d'action de l'ipilimumab.....	163
Figure 50. Représentation des sites de liaison supposés de l'ET, du rendomab-B1 et du rendomab-B4 sur ET _B R.....	204
Figure 51. Alignement des séquences d'ET _B R humain et murins.	206
Figure 52 : Aperçu des principales caractéristiques des différents formats d'Ac.	213
Figure 53 : Représentation schématique d'une co-cristallisation de protéine membranaire intégrale avec des fragments d'anticorps.	214

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a. : acide aminé
Ab : *Antibody* (anticorps)
A β : peptide Amyloïde β
Ac : Anticorps
AC : Adénylate Cyclase
ACE : *Angiotensin Converting Enzyme* (enzyme de conversion de l'angiotensine)
ACh : AcétylCholine
AChE : AcétylCholineEstérase, EC 3.1.1.7
AcM : Anticorps Monoclonal
ADC : *Antibody-Drug Conjugate* (anticorps conjugué à une molécule toxique)
ADCC : *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps)
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion de l'Ac
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADPh : *Antibody-Dependent Phagocytosis* (phagocytose dépendante de l'anticorps)
Ag : Antigène
AJCC : *American Joint Committee on Cancer*
ALM : *Acral Lentiginous Melanoma* (mélanome lentigineux acral)
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPc : AMP cyclique
ANF : *Atrial Natriuretic Factor* (facteur atrial natriurétique)
ANP : *Atrial Natriuretic Peptide* (peptide natriurétique atrial)
AP-1 : *Activator Protein-1*
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
AT₁R : Récepteur de l'Angiotensine II de type 1

 β -arr1, β -arr2 : β -Arrestine 1, 2
Bcl-2 : *B-cell lymphoma protein-2*
BCR : *B-Cell Receptor* (récepteurs d'antigènes de lymphocytes B)
BCR-ABL : *Breakingpoint Cluster Region* du proto-oncogène Abl
bFGF : *basic Fibroblast Growth Factor* (facteur de croissance des fibroblastes basique)
B_{MAX} : *MAXimum number of Binding sites* (nombre maximal de sites de liaison)
BRCA1, BRCA2 : *BR*east *C*ANcer 1, 2 (gènes touchés par des mutations dans certains cancers du sein)
BSA : *Bovin Serum Albumin* (albumine de sérum bovin)
BsAb : *Bispecific Antibody* (anticorps bispécifique)
 β 2AR : *β 2 Adrenergic Receptor* (récepteur β 2 adrénergique)

CathA : Cathepsine A
CCL2 : *Chemokine (C-C motif) Ligand 2* (chimiokine)
CCP : *Clathrine-Coated Pit* (puits recouvert de clathrine)
CDC : *Complement-Dependent Cytotoxicity* (cytotoxicité dépendante du complément)
CDKN2A : *Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A* (inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 2A)
CDK4 : *Cyclin-Dependent Kinase 4* (kinase cycline-dépendante 4)

CDR : *Complementary-Determining Regions* (régions déterminant la complémentarité)
CEA : *Carcinoembryonic Antigen* (antigène carcinoembryonnaire)
C_H : *Constant Heavy region* (région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines)
CHO : *Chinese Hamster Ovary* (ovaire de hamster chinois, lignée cellulaire)
CHO-ET_AR : lignée de CHO surexprimant de façon stable ET_AR
CHO-ET_BR : lignée de CHO surexprimant de façon stable ET_BR
C_L : *Constant Light region* (région constante de la chaîne légère des immunoglobulines)
CLEOPATRA : *CLinical Evaluation Of Pertuzumab And TRAstuzumab*
CLL : *Chronic Lymphocytic Leukaemia* (leucémie lymphoïde chronique)
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML : Cellules Musculaires Lisses
CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
COX1, COX2 : Cyclooxygénases 1, 2
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRE : *Cyclic AMP Responsive Element*
CRS : *Cytokine Release Syndrome* (syndrome de libération de cytokines)
CSCs : Cellules Souches Cancéreuses
CTGF : *Connective Tissue Growth Factor* (facteur de croissance du tissu conjonctif)
CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique, CD152)

DAG : DiAcyGlycérol
DC : *Dendritic Cell* (cellule dendritique)
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
D₃ : récepteur Dopaminergique de type 3

ECE : Enzyme de Conversion de l'Endothéline
EC₅₀ : *half maximal Effective Concentration* (concentration efficace médiane)
edn-1 : gène codant l'endothéline de type 1
EDNRA : gène codant le Récepteur de type A de l'Endothéline
EDNRB : gène codant le Récepteur de type B de l'Endothéline
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
EEA1 : *Early Endosome Antigen 1* (antigène 1 de l'endosome précoce)
EGF : *Epidermal Growth Factor* (facteur de croissance épidermique)
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* (récepteur du facteur de croissance épidermique)
ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EMA : *European Medicines Agency* (Agence Européenne des Médicaments)
EMT : *Epithelial-Mesenchymal Transition* (transition épithélio-mésenchymateuse)
eNOS : *endothelial NO-Synthase* (NO-synthase endothéliale)
ENTHUSE : *Endo THElin A USE*
Epac : *Exchange protein directly activated by cyclic AMP*
Ep-CAM : *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (molécule d'adhésion cellulaire épithéliale)
ER-α : *Estrogen Receptor-α* (récepteur à l'estrogène)
ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase* (kinase de la famille des MAPK)
ET : EndoThéline
ET_AR : Récepteur de type A des ET
ET_BR : Récepteur de type B des ET
ET_CR : Récepteur de type C des ET
ET-1-FAM : *ET-1-Fluorescein AMidite* (ET-1 marquée avec de la fluorescéine)
ET-3-FAM : *ET-3-Fluorescein AMidite* (ET-3 marquée avec de la fluorescéine)

EV : *Empty Vector* (vecteur vide)

E1, E2, E3 : boucles Extracellulaires **1, 2, 3** du RCPG

Fab : *Fragment antigen binding* (fragment de liaison à l'antigène)

FACS : *Fluorescent-Activated Cell Sorter* (cytométrie de flux)

FAK : *Focal Adhesion Kinase* (kinase des adhésions focales)

FAS : *Apoptosis-Stimulating Fragment* (récepteur de surface médiant la mort cellulaire par apoptose)

FASL : *FAS Ligand*

Fc : Fragment cristallisable d'une immunoglobuline

FcR : *Fc Receptor* (récepteur des fragments constants des immunoglobulines)

FcγR : *Fc γ Receptor* (récepteur des fragments constants des immunoglobulines G)

FcRn : *Fc Receptor neonatal*

FDA : *US Food and Drug Administration*

FGF : *Fibroblast Growth Factor* (facteur de croissance des fibroblastes)

FOXO : *Forkhead box O*

FR : *Framework Region* (région charpente)

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes)

GEF : *Guanine nucleotide Exchange Factor*

GIP : *GPCR-Interacting Proteins*

GJICs : *Gap Junction Intercellular Communications* (communications intercellulaires à jonctions gap)

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages)

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GRK : *G protein-coupled Receptor Kinase* (kinase de RCPG)

GS : *Glutamine Synthetase*

HAMA : *Human Anti-Mouse Antibodies* (anticorps humains anti-anticorps de souris)

HAS : Haute Autorité de Santé

HDL : *High Density Lipoprotein* (lipoprotéine de haute densité)

HEK : *Human Embryonic Kidney* (rein embryonnaire humain, lignée cellulaire)

HER-2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

HH : *HedgeHog* (voie Hedgehog)

HIF-1 : *Hypoxia-Inducible Factor 1* (facteur induit par l'hypoxie)

HIF-1α : sous unité α de **HIF-1**

HRE : *Hormone Response Element* (élément de réponse aux hormones)

HRE : *Hypoxia Response Element* (élément de réponse à l'hypoxie)

HV : région HyperVariable

ICAM1 : *InterCellular Adhesion Molecule 1* (molécule d'adhésion intercellulaire de type 1)

IF : ImmunoFluorescence

IFN : InterFéroN (cytokine)

Ig : *Immunoglobulin* (immunoglobuline)

IGF : *Insulin-Like Growth Factor-1* (facteur de croissance 1 analogue à l'insuline)

IL : InterLeukine (cytokine)

Ile : Isoleucine

ILK : *Integrine-Linked Kinase* (kinase liée aux intégrines)

INCa : Institut National du Cancer

IPAH : PAH Idiopathique

IP3 : Inositol triphosphate

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (motifs activateurs dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs)

ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs* (motifs inhibiteurs dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs)

I1, I2, I3 : boucles Intracellulaires **1, 2, 3** du RCPG

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

KO : *KnockOut*

L : Litre

LAMP-1 : *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1* (protéine membranaire 1 associée aux lysosomes)

L_B : Lymphocytes B

LDL : *Low Density Lipoprotein* (lipoprotéine de basse densité)

LM : *Lentigo Maligna* (mélanome de Dubreuilh, *in situ*)

LMM : *Lentigo Malignant Melanoma* (mélanome de Dubreuilh, invasif)

L_T : Lymphocyte T

M : Molaire (mol/L)

mAb : *monoclonal Antibody* (anticorps monoclonal)

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases* (protéines kinases activées par des agents mitogènes)

MC1R : *MelanoCortin 1 Receptor* (récepteur de la mélanocortine 1)

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MFI : *Mean Fluorescence Intensity* (intensité moyenne de fluorescence)

MITF : *MIcrophthalmia-associated Transcription Factor* (facteur de transcription associé à la microphthalmie)

MMAE : MonoMéthyle Auristatine E

MMP : *Matrix MetalloProteinase* (métalloprotéase matricielle)

MYPT1 : sous unité régulatrice de la myosine phosphatase

NCC : *Neural Crest Cells* (cellules des crêtes neurales)

NEP : *Neutral EndoPeptidase* (endopeptidase neutre)

NF-κB : *Nuclear Factor-Kappa B* (facteur nucléaire κB)

NGF : *Nerve Growth Factor* (facteur de croissance du tissu nerveux)

NK : *Natural Killer Cell* (cellules tueuses naturelles)

NO : monoxyde d'azote

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAH : *Pulmonary Arterial Hypertension* (hypertension artérielle pulmonaire)

PAK : *Activated Protein Kinase*

PAP : *Prostatic Acid Phosphatase* (phosphatase acide prostatique)

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

pb : paire de bases

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (cellule mononucléaire du sang périphérique)

PBS : *Phosphate Buffer Saline* (tampon phosphate salin, tampon isotonique)
PDGF : *Platelet Derived Growth Factor* (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PDGFR : *PDGF Receptor* (récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PD-L1 : *Programmed Death Ligand-1* (ligand de la protéine de mort programmée 1)
PDZ : *post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), *zonula occludens-1 protein* (zo-1) (domaine structural protéique)
PD-1 : *Programmed Death-1* (protéine de mort programmée 1)
PE : *PhycoErythrine* (fluorochrome)
PFA : *ParaFormAldéhyde*
PGE2 : *ProstaGlandine E2*
PHD : *Prolyl Hydroxylase Domain*
PIP2 : *PhosphatidylInositol bisphosphate*
PKA : *Protéine Kinase A*
PKC : *Protéine Kinase C*
PKG : *Protéine Kinase G*
PLC : *PhosphoLipase C*
PR : *Progesterone Receptor* (récepteur de la progestérone)
PrP : *Prion Protein* (protéine prion)
PS : *PhosphatidylSérine*
PTEN : *Phosphatase and TENSin homolog* (phosphatase et homologue de la tensine, suppresseur de tumeur)

RAF : *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (kinase de la voie MAPK)
RANKL : *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (ligand du récepteur RANK)
RAS : *Rat Sarcoma* (petite GTPase de la voie des MAPK)
RCPG : *Récepteurs Couplés aux Protéines G*
RGP : *Radial Growth Phase* (phase de croissance radiale)
RHO-GDI2 : *RHO GDP-Dissociation Inhibitor 2*
RMN : *Résonance Magnétique Nucléaire*
ROC : *Receptor-Operated Ca²⁺ Channel*
ROCK : *RhoKinase*
ROS : *Reactive Oxygen Species* (espèces réactives de l'oxygène)
rpm : *Rotations par minute*
RTK : *Récepteur à activité Tyrosine Kinase*

ScFv : *Single-chain variable Fragments* (fragments variables simple chaîne)
Scpep1 : *Serine carboxypeptidase 1*
SDS/PAGE : *Sodium DodecylSulfate / PolyAcrylamid Gel Electrophoresis*
SH2 : *Scr Homology 2* (domaine protéique)
SNC : *Sérum Normal de Chèvre*
SRTX : *SaRafoToXine*
SSM : *Superficial Spreading Melanoma*
SVF : *Sérum de Veau Foetal*

TAA : *Tumor-Associated Antigen* (antigène spécifique des cellules tumorales)
TAM : *Tumor-Associated Macrophage* (macrophage associé à la tumeur)
TCR : *T-Cell Receptor* (récepteur d'antigènes des cellules T)
TGF : *Transforming Growth Factor* (facteur de croissance transformant)
TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (lymphocytes infiltrant les tumeurs)
TKI : *Tyrosine Kinase Inhibitor* (inhibiteur de tyrosine kinase)
TMD : *TransMembrane Domain* (domaine transmembranaire)
TNBC : *Triple-Negative Breast Cancer* (cancer du sein triple négatif)

TNF : *Tumor Necrosis Factor* (facteur de nécrose tumorale)

Treg : *regulatory T cell* (lymphocytes T régulateurs)

Trp : Tryptophane

TYR : TYRosinase

UE : Unité Ellman

UEM : Unité Epidermique de Mélanisation

UICC : *Union for International Cancer Control*

UV : UltraViolet

Val : Valine

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor* (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

VEGFR : *VEGF Receptor* (récepteur du VEGF)

Vezf1 : *Vascular endothelial zinc finger 1*

VGP : *Vertical Growth Phase* (phase de croissance verticale)

V_H : *Variable Heavy region* (domaine variable de la chaîne lourde des immunoglobulines)

V_L : *Variable Light region* (domaine variable de la chaîne légère des immunoglobulines)

VR : *Vanilloid Receptors* (récepteurs vanilloïdes)

WT : *Wild Type* (type sauvage)

5-FU : Fluoro-Uracile

INTRODUCTION

A. Le système endothéline

1. Les endothélines

1. 1. Découverte de l'endothéline

Au début des années 1980, R. Furchgott fit l'observation que la modulation du tonus des muscles lisses artériels ne dépendait pas exclusivement de l'acétylcholine (ACh), mais que les cellules endothéliales étaient nécessaires à l'activité vasoactive de l'ACh¹. Parallèlement à l'identification du monoxyde d'azote (NO) comme facteur relaxant issu de l'endothélium², l'existence d'un facteur libéré par les cellules endothéliales et crucial dans la régulation de la contractilité des muscles vasculaires lisses a été mise en évidence par différents groupes³⁻⁶. La purification de ce puissant peptide vasoconstricteur, jusqu'alors inconnu, fût achevée en 1988 par M. Yanagisawa et ses collaborateurs : isolé à partir de milieu conditionné de culture de cellules endothéliales de porc, ce nouveau peptide, dont le gène fût identifié, fût nommé endothéline (ET)⁷. Peu de temps plus tard furent découverts deux autres gènes codant des séquences en acides aminés très proches de celle précédemment identifiée ; c'est ainsi que les trois isoformes composant la famille des ET humaines furent nommées endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3)^{8, 9}.

1. 2. Structure des endothélines

L'ET-1 est l'isoforme la plus représentée et la plus largement exprimée de la famille des ET. L'ET-1 est un peptide composé de 21 acides aminés (a.a.) (**Figure 1**). Ce peptide possède une partie hydrophobe en C-terminal et deux ponts disulfures entre ces cystéines 1 et 15 et ces cystéines 3 et 11⁹, ce qui lui confère une structure compacte. Trois chaînes latérales chargées sont présentes des résidus 8 à 10. Les ET-2 et ET-3 ne diffèrent de l'ET-1 que par 2 et 6 acides aminés respectivement.

Une autre famille peptidique est très proches structuralement de la famille des ET : il s'agit de celle des sarafotoxines (SRTX) qui ont pour la première fois été isolées

et caractérisées à partir du venin du serpent *Atractaspis engaddensis*^{10, 11}. Différentes isoformes de ces peptides cardiotoxiques sont décrites, dont SRTX-a, SRTX-b et SRTX-c¹². L'alignement de séquences entre les ET et des SRTX montre une forte identité de 60% (**Figure 1**). Les quatre cystéines interconnectées en ponts disulfures, la partie C-terminale hydrophobe ainsi que les trois acides aminés à chaîne polaire décrits dans le cas des ET sont conservés chez les SRTX.

Les ET, qui ont été décrites chez l'homme comme le vasoconstricteur le plus puissant et dont l'action est la plus prolongée^{13, 14}, forment, avec les SRTX, une famille de puissants peptides vasoactifs.

L'étude tridimensionnelle, par RMN et cristallographie, de la structure d'ET-1 et de SRTX-b¹⁵⁻¹⁷ a mis en évidence l'existence d'une structure étendue en N-terminal, suivie d'une courbure puis d'une hélice α des résidus 9 à 15. La partie C-terminale du peptide paraît quant à elle peu structurée. Il est communément admis que la partie C-terminale du peptide interviendrait dans la transduction du signal vasoactif caractéristique de l'ET¹⁸, alors que la sélectivité du ligand pour le récepteur impliquerait d'avantage la partie N-terminale du peptide¹⁹.

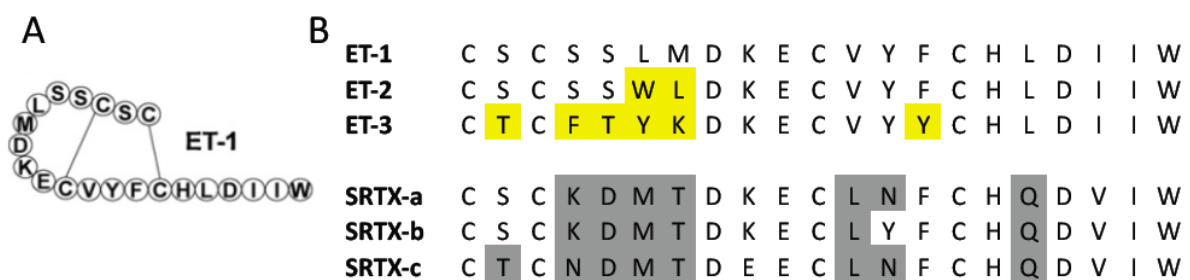


Figure 1. Structure des endothélines et des sarafotoxines. (A) Structure de l'ET-1. (B) Comparaison des séquences des ET et des SRTX. Les a.a. surlignés en jaune et en gris diffèrent de ceux présents dans la séquence de l'ET-1.

1. 3. Biodistribution des endothélines

Les gènes codant les 3 ET, *edn-1*, *edn-2* et *edn-3*, se trouvent respectivement sur les chromosomes 6, 1 et 20. Chez l'homme, les ET sont exprimées dans de très nombreux types cellulaires ; aussi, les organes, tissus ou types cellulaires cités ci-dessous ne constituent pas une liste exhaustive des sites de libération des ET mais donnent plutôt une idée de la distribution quasi ubiquitaire de ces peptides.

ET-1	ET-2	ET-3
Cellules endothéliales	Cellules épithéliales	Cellules stromales
Cardiomyocytes	rénales	neuronales
Cellules musculaires	Cellules stromales	Cellules gliales
lisses aortiques	gastrointestinales	Cellules surrénales
Cellules épithéliales	Cardiomyocytes	Cellules épithéliales
pulmonaires	Cellules du trophoblaste	pulmonaires
Cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Cellules épithéliales
rénales	utérines	intestinales
Cellules stromales		Cellules épithéliales
neuronales		rénales
Astrocytes		
Terminaisons nerveuses		
neurohypophysaires		
Cellules mésangiales		
rénales		
Cellules de Sertoli		
Cellules endométriales		
Cellules épithéliales		
mammaires		
Leucocytes		
Myofibroblastes		
Cellules épithéliales		
du canal cholédoque		
Cellules β des îlots		
de Langerhans		

Figure 2. Expression des endothélines. Les ET sont exprimées par des types cellulaires extrêmement variés, la source principale d'ET-1 étant l'endothélium vasculaire. D'après Khimji et Rockey, 2010²⁰.

Peptide le plus représenté de la famille des ET, l'ET-1 est majoritairement produite par les cellules vasculaires endothéliales⁷ (**Figure 2**). Elle est également libérée par les cellules des muscles lisses, par les cellules épithéliales des voies aériennes et des reins, mais aussi par les macrophages²¹, les fibroblastes, les cardiomyocytes²², les neurones du cerveau²³⁻²⁵ et par les cellules β des îlots de Langerhans²⁶. L'ET-2 est notamment exprimée dans les cellules épithéliales de l'intestin, des reins et de l'utérus (**Figure 2**). Quant à l'ET-3, elle est libérée par les neurones du cerveau^{23, 24}, les cellules épithéliales du tubule rénal²⁷, les cellules épithéliales intestinales (**Figure 2**) et elle joue également un rôle d'intermédiaire dans la libération de vasodilatateurs, dont le NO et la prostacycline.

La concentration en ET-1 dans le plasma est faible (de 0,7 à 5 pg/mL)²⁸, c'est à dire sous son seuil d'activité pharmacologique. Par conséquent, dans les conditions physiologiques normales les ET ne peuvent être des hormones circulantes. Elles agissent de façon autocrine et paracrine au niveau des organes dans lesquels elles

sont libérées.

1. 4. La biosynthèse des endothélines

La synthèse des ET biologiquement actives est un processus nécessitant l'intervention de différentes protéases (**Figure 3**). L'analyse de la séquence d'ADNc a mis en évidence que les ET étaient produites à partir de précurseurs d'environ 200 acides aminés, les prépro-endothélines (prépro-ET). Ces précurseurs sont clivés au niveau de sites dibasiques par des endopeptidases de type furine, formant ainsi des intermédiaires biologiquement inactifs. Ces peptides de 37 à 41 acides aminés sont appelés big endothélines (big-ET) ou proendothélines (pro-ET) (**Figure 3**). Les ET actives, de 21 acides aminés, sont obtenues suite au clivage de ces big-ET, au niveau de la liaison Trp-Val de la big-ET-1 (**Figure 3**) et de la big-ET-2 et au niveau de la liaison Trp-Ile de la big-ET-3⁸. La précision de cette coupure se révèle primordiale à l'activité du peptide, puisque l'ET-1 obtenue par clivage un acide aminé en amont (a.a. 20-21) ou en aval (a.a. 22-23) du site s'avère trois fois moins puissante²⁹. Cette dernière étape de clivage est réalisée par une famille de métalloprotésases membranaires à zinc appartenant à la surperfamille des néprilysines : les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE)^{30, 31}. A l'heure actuelle trois membres de cette famille, responsables de la dernière étape de maturation des ET, ont été identifiés. Il s'agit de l'ECE-1, l'ECE-2 et l'ECE-3. Ces trois enzymes sont partiellement inhibées *in vitro* par le phosphoramidon³². L'ECE-1 est présente dans de nombreux types de cellules, y compris les cellules endothéliales, et son activité maximale est atteinte à pH neutre. *In vitro*, les cellules transfectées avec ECE-1 sont capables de cliver la big-ET-1 intracellulaire, mais également extracellulaire³⁰. L'ECE-2 est exprimée dans les neurones. Son pic d'activité est atteint à pH acide, ce qui suggère une activité de cette enzyme sur le big-ET endogène au niveau du trans-golgi, où le continu vésiculaire est acidifié³³. Le fait que des souris doublement invalidées pour les gènes codant l'ECE-1 et l'ECE-2 conservent des niveaux élevés d'ET mature suggère l'existence d'autres enzymes capables de réaliser cette dernière étape de maturation. Ainsi, les ET matures peuvent être produites par les ECE dans le cytoplasme et également à la surface des cellules. *In vitro*, l'ECE-1 comme l'ECE-2 ont une affinité plus forte pour la big-ET-1, que pour la big-ET-2 ou big-ET-3. L'ECE-3, qui a été purifiée à partir de microsomes d'iris bovin³⁴, est, quant à elle, spécifique de la big-ET-3. Une voie alterne de cette dernière étape de maturation existe. En effet la big-ET-1 peut être clivée par

une enzyme alternative, une chymase, ce qui aboutit à la production d'une ET de 31 acides aminés³⁵⁻³⁷.

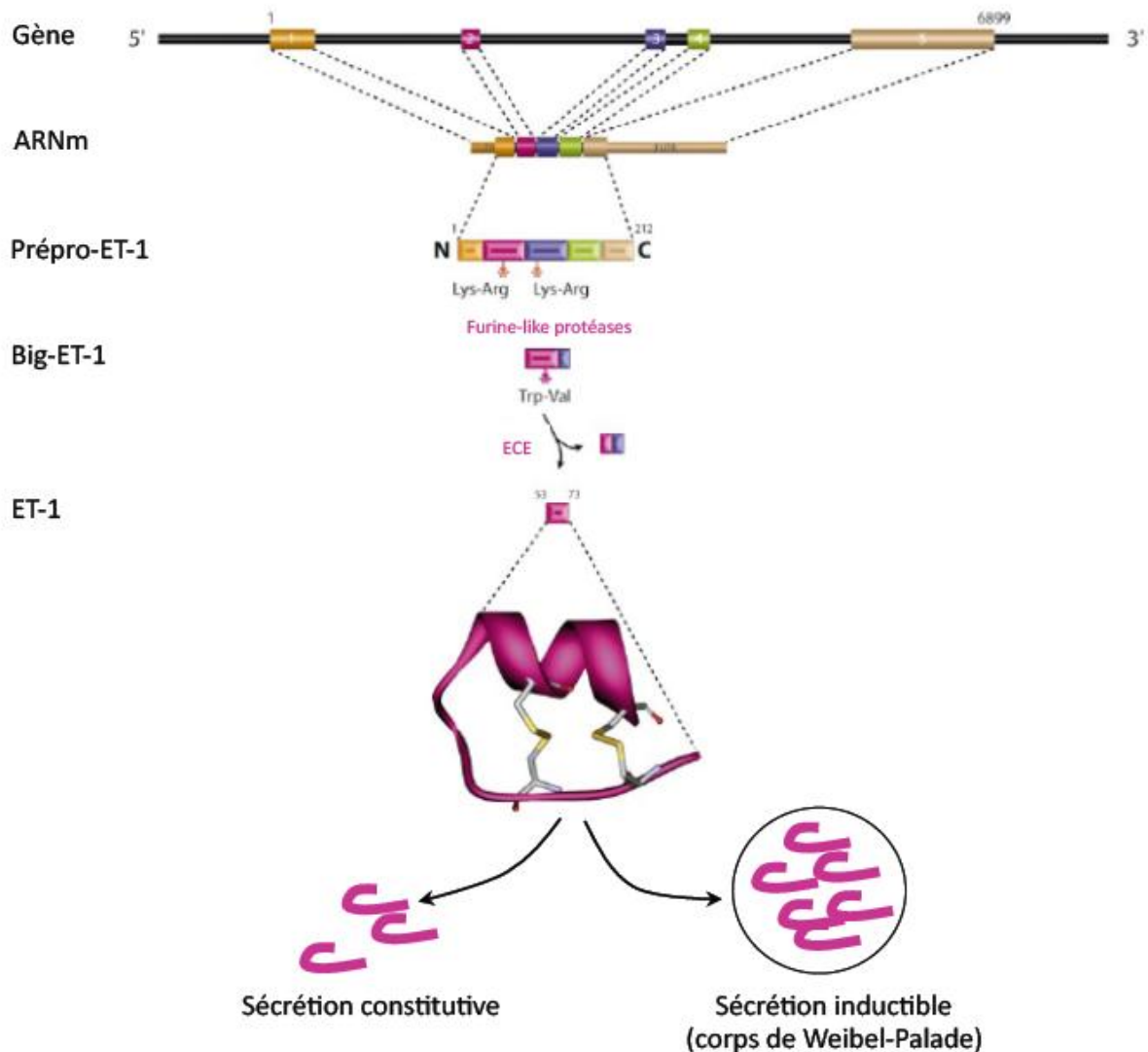


Figure 3. Biosynthèse de l'endothéline-1. L'ARNm de la prépro-ET-1 est synthétisé suite à l'activation transcriptionnelle du gène *edn-1*. La prépro-ET-1 est clivée par des endopeptidases de type furine, produisant la big-ET-1, intermédiaire biologiquement inactif, lui-même clivé par les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE). L'ET-1 ainsi synthétisée est sécrétée de façon inductible ou constitutive. Les voies de production des ET-2 et ET-3 sont supposées être similaires. D'après Stow *et al.*, 2011³⁸.

1. 5. Régulation de la biosynthèse et de la libération des endothélines

La biodisponibilité d'un ligand extracellulaire dépend de différents niveaux de régulation : la synthèse, le stockage et la libération.

Dans les cellules endothéliales, l'ET-1 peut être stockée dans des granules spécialisés appelés corps de Weibel-Palade³⁹ (**Figure 3**). La libération du contenu de ces granules est régulée par l'action de différents stimuli, tels que l'hypoxie, la thrombine ou encore la force de cisaillement (*shear stress*)⁴⁰ et a majoritairement lieu du côté basolatéral de l'endothélium⁴¹. Cette sécrétion polarisée permet une libération du peptide vasoactif au plus près des cellules musculaires lisses sous-jacentes sur lesquelles il agit.

Cependant, ces vésicules de stockage n'existent pas dans tous les types cellulaires produisant l'ET-1. Ainsi, dans ces autres cellules l'ET-1 produite n'est libérée que par la voie constitutive des vésicules de sécrétion⁴² (**Figure 3**).

Qu'ET-1 soit libérée de façon constitutive ou contrôlée, une régulation de la synthèse est indispensable au maintien de l'activité physiologique du ligand. De nombreuses études indépendantes ont mis en évidence que la transcription du gène codant pour la prépro-ET-1, *edn-1*, était le premier niveau de régulation. En effet, la capacité d'*edn-1*, (codant pour un ARNm de 2,8 kb) à répondre à différentes hormones et à des stimuli variés est essentielle au maintien d'une expression correcte d'ET-1, d'un point de vue quantitatif, spatial et temporel.

C'est la région promotrice localisée en amont du gène qui est principalement responsable de cette régulation de la transcription (**Figure 4**). Cette région présente des éléments régulateurs classiques comme les boîtes TATA (-31 pb) et CAAT (-98 pb) qui entrent en jeu dans le recrutement du complexe de l'ARN polymérase II⁸. Des séquences consensus sont présentes au niveau du promoteur proximal, telles que *Vascular endothelial zinc finger 1* (*Vezf1*), des sites de fixation de *forkhead box O* (*FOXO*), d'*activator protein-1* (*AP-1*, recrutement des sous-unités Fos et Jun) et de *Smad*³⁸. Il a été montré qu'en cas d'hypoxie la synthèse d'ET-1 était sous le contrôle du recrutement au promoteur d'un complexe protéique incluant *AP-1*, *p300*, *HIF-1* et *GATA-2*⁴³. D'autres éléments régulateurs positionnés en amont du promoteur ont été identifiés. Les éléments de réponse aux hormones (*hormone response element*, *HRE*) permettent par exemple une stimulation par l'aldostérone dans les cardiomyocytes⁴⁴. Un site de liaison de *NF-κB* (pour *nuclear factor-kappa B*) et un motif *E-box* ont également été mis en évidence. Par ailleurs, des études plus récentes ont montré que

le promoteur d'*edn-1* était sensible au calcium intracellulaire et à la calmoduline⁴⁵. Au contraire, dans les cellules endothéliales le NO, la prostacycline et le facteur atrial natriurétique (*atrial natriuretic factor/peptide*, ANF/ANP) ont un effet inhibiteur sur la transcription d'*edn-1*.

Par ailleurs, des mécanismes épigénétiques, comme la méthylation du gène et les modifications des histones, interviennent dans la régulation d'*edn-1*⁴⁶. Ceci a notamment été étudié dans le cas de cellules du cancer du sein ayant un tropisme pour les os⁴⁷.

Des stimuli mécaniques comme le flux sanguin et les forces de cisaillement ont également été décrits comme responsables de la libération d'ET-1^{48, 49}.

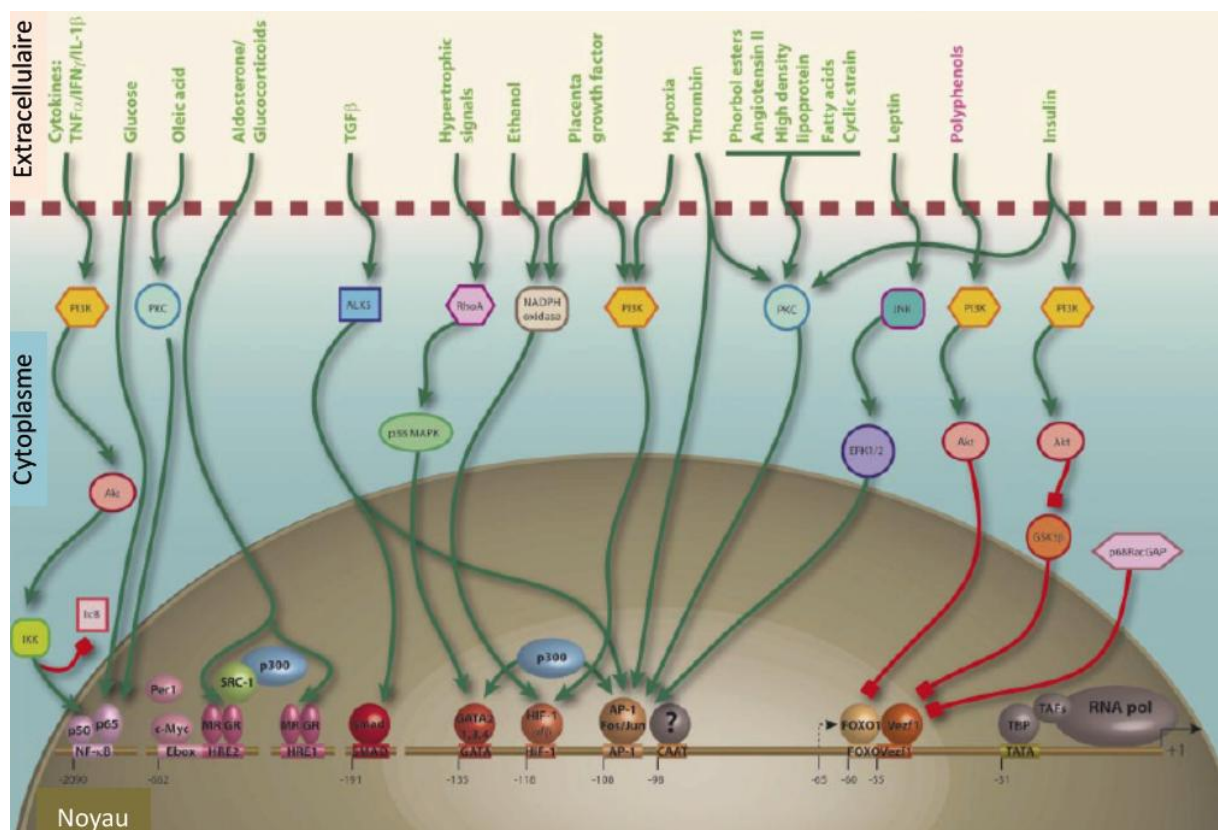


Figure 4. Régulation du promoteur d'*edn-1*. Proposé par Stow *et al.*, 2011³⁸.

1. 6. Dégradation et clairance de l'endothéline

Si la biosynthèse de l'ET est un processus hautement contrôlé, le taux d'ET circulante n'en est pas moins régulé par la dégradation et par l'élimination du peptide. En effet la demi-vie de l'ET-1 est d'environ 2 à 7 min dans la circulation⁵⁰.

Il a été démontré que dans le rein l'endopeptidase EC 3.4.24.11, aussi appelée *neutral endopeptidase* 24.11 (NEP), précédemment connue pour ces propriétés de

dégradation de l'ET *in vitro*, contrôlait le *turnover* de l'ET-1. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de cette endopeptidase augmente de plusieurs fois le niveau d'excrétion de l'ET-1 chez le rat^{51, 52}. Cette enzyme, membre de la famille des métalloendopeptidase, est la plus décrite dans le catabolisme d'ET-1.

Plus récemment, le groupe de A.V. Pshezhetsky a mis en évidence le rôle de deux autres enzymes dans la dégradation de l'ET-1. Une première étude utilisant des souris exprimant la cathepsine A (CathA), une carboxypeptidase lysosomale, sous une forme catalytiquement inactive, suggère un rôle important de cette enzyme dans la dégradation de l'ET-1. En effet, les souris exprimant CathA inactive présentent une diminution du taux de dégradation de l'ET-1 et une pression artérielle significativement augmentée⁵³. Plus tard, une seconde étude portant sur la *retinoid-inductible lysosomal serine carboxypeptidase 1* (Scpep1), homologue de la CathA, a montré que cette enzyme jouait le même rôle que la CathA⁵⁴. Ainsi CathA et Scpep1 participeraient ensemble au contrôle des fonctions physiologiques et pathophysiologiques régulées par ET-1.

Le rein n'est pas le seul organe impliqué dans la clairance de l'ET-1 puisque le poumon, qui est à la fois un site important de production de l'ET-1, est également site d'élimination du peptide. Après sa liaison à ET_BR, l'ET-1 est endocytée et dégradée⁵⁵.

2. Les récepteurs des endothélines

2. 1. Découverte et structure des récepteurs des endothélines

Une deuxième étape importante de la découverte de l'axe endothéline fut franchie en 1990, lorsque deux équipes indépendantes publièrent les résultats du clonage des deux ADNc codant pour les récepteurs des ET^{56, 57}. Ces deux récepteurs furent nommés récepteur ET_A et récepteur ET_B (respectivement ET_AR et ET_BR) (**Figure 5**). Chez l'homme, les gènes *EDNRA* et *EDNRB* codant ET_AR et ET_BR sont localisés sur les chromosomes 4 et 13 respectivement et présentent 64% d'homologie. Pour un même récepteur l'homologie entre le gène humain et celui du rat est d'environ 90%. ET_AR est une protéine constituée de 427 a.a., correspondant à une masse apparente de 49 kDa, alors qu'ET_BR en compte 442, pour une masse apparente de 50 kDa. Un troisième récepteur spécifique d'ET-3, qui ne sera pas présenté ici, car étant sujet à controverse et n'ayant pas été décrit chez les

mammifères, fut identifié chez *Xenopus laevis* et nommé ET_CR⁵⁸. On notera qu'il existe chez le rat un récepteur angiotensine II/ET-1⁵⁹ et qu'un nouvel ET_BR a été identifié chez les oiseaux⁶⁰. Par ailleurs, des données pharmacologiques *in vivo* ont conduit à classer ET_BR en deux sous types, cependant sans que des études moléculaires puissent confirmer cette dichotomie⁶¹.

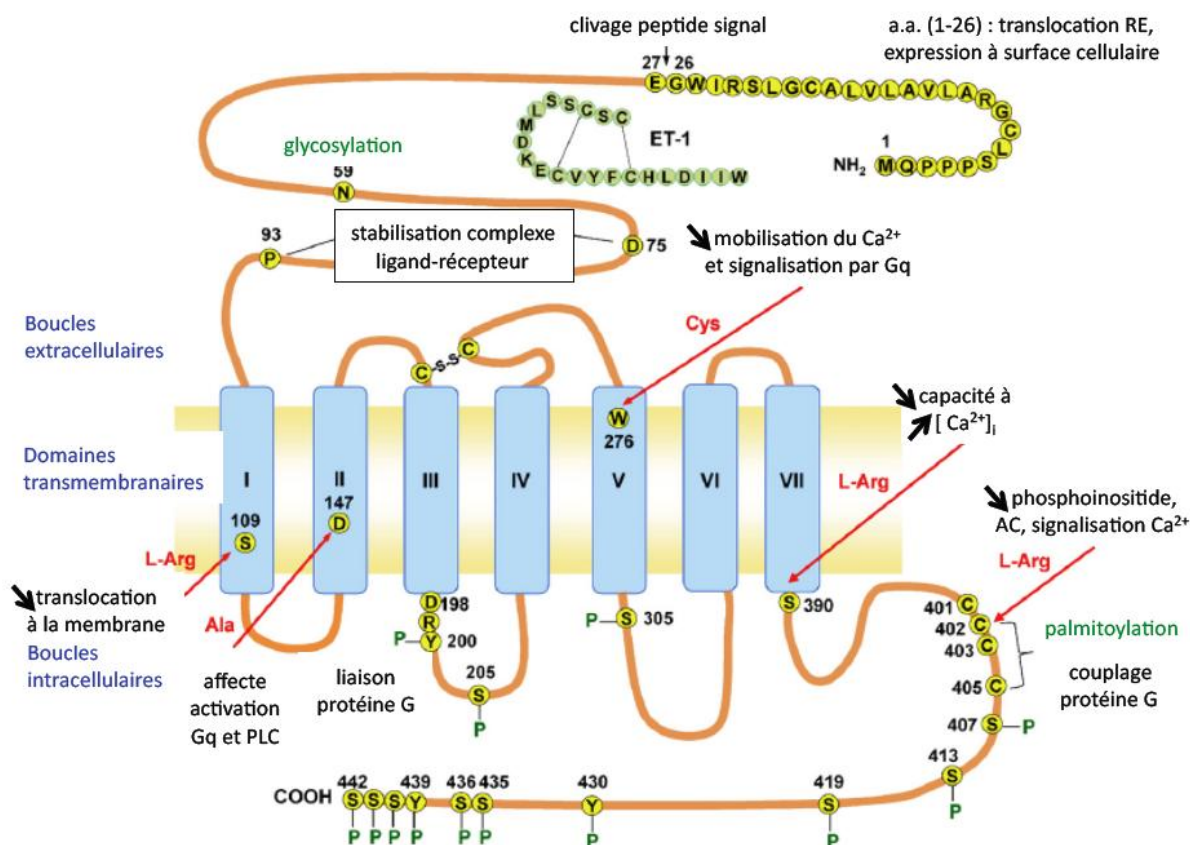


Figure 5. Structure du récepteur ET_B humain. Comme ET_AR, ET_BR se compose d'un domaine N-terminal extracellulaire, de sept domaines transmembranaires, de trois boucles intra- et trois boucles extracellulaires, ainsi que d'un domaine C-terminal intracellulaire. Certains a.a. sont étroitement associés à la signalisation du récepteur, de même que des modifications post-traductionnelles. Proposé par Mazzuca et Khalil, 2012⁶².

Contrairement à certains récepteurs dont le premier segment transmembranaire suffit à la translocation dans la membrane du réticulum endoplasmique, ET_AR et ET_BR possèdent chacun un peptide signal nécessaire à cette insertion, respectivement de 16 et 26 acides aminés. Ce peptide est clivé dans la lumière du réticulum endoplasmique durant la biosynthèse des récepteurs^{63, 64}. Ces récepteurs possèdent une séquence N-terminale extracellulaire d'environ 100 acides aminés, sept domaines transmembranaires (*transmembrane domain*, TMD) de 22 à 26 acides aminés hydrophobes chacun, trois boucles extracellulaires (E1, E2 et E3), trois boucles

intracellulaires (I1, I2 et I3) et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Ces récepteurs appartiennent à la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) et plus précisément à la superfamille A des « *rhodopsin-like receptors* ». ET_AR a une affinité subnanomolaire cent fois meilleure pour ET-1 et ET-2 que pour ET-3⁵⁶. En revanche, ET_BR présente une affinité subnanomolaire équivalente pour les trois ET⁵⁷. La liaison des ET à leurs récepteurs mettrait en jeu des acides aminés présents au niveau des boucles extracellulaires de ceux-ci. Alors que le site de liaison d'ET_AR aurait une forme de tunnel étroit lui conférant des propriétés de sélectivité pour la partie N-terminale des ET, le site liaison d'ET_BR serait au contraire en forme de large entonnoir capable de recevoir des ligands de formes et de propriétés différentes¹⁹. Une fois l'ET liée, les récepteurs des ET sont responsables de l'activation de diverses protéines G et de nombreuses voies de signalisation qui seront détaillées dans la suite dans cette introduction (A. 3.).

Un antagoniste spécifique d'ET_AR issu de la fermentation de *Streptomyces misakiensis* a été rapidement identifié, le pentapeptide cyclique BE1857A. L'antagoniste d'ET_AR communément utilisé, le BQ123, a été dérivé de cette substance^{65, 66}. C'est l'étude de la structure et de l'activité de cet antagoniste spécifique d'ET_AR qui a permis la production d'un tripeptide linéaire antagoniste d'ET_BR, le BQ788⁶⁷. Ces deux antagonistes sont très largement utilisés en recherche fondamentale. Ils ont notamment permis une étude plus précise des voies de signalisation en aval des deux RCPG. Par ailleurs, ces antagonistes spécifiques des récepteurs des ET, administrés par injection dans la circulation, ont fait l'objet de diverses études précliniques. Chez le rat, l'utilisation de BQ123 dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque a permis une amélioration des fonctions cardiaques de l'animal, évitant notamment une hypertrophie du ventricule gauche⁶⁸. Le BQ123 a aussi montré son efficacité lors de son utilisation chez des modèles animaux de pression artérielle et d'hypertension pulmonaire. Cet antagoniste a également été étudié dans des modèles animaux de métastases osseuse et hépatique, entre autres, mettant en évidence le rôle de l'axe ET-1/ET_AR dans l'invasivité et la croissance tumorales^{69, 70}. Dans le mélanome, le BQ788 a, quant à lui, permis de démontrer les actions pro-tumorigène d'ET_BR : l'antagoniste spécifique d'ET_BR aurait une action inhibitrice sur la croissance de lignées de mélanomes humains et également *in vivo*, sur la croissance de xénogreffes chez la souris^{71, 72}. Les BQ123 et BQ788 présentent cependant comme limitation qu'ils sont sensibles à la dégradation enzymatique, une fois injectés.

De façon simultanée, des antagonistes oraux des récepteurs des ET ont été développés. Le paragraphe 5 de cette première partie introductive traite de ces antagonistes.

2. 2. Biodistribution d'ET_AR et d'ET_BR

Dans des conditions physiologiques normales, les récepteurs des ET sont distribués dans de nombreux tissus, cependant avec des niveaux d'expression différents. Schématiquement, dans le système vasculaire, alors qu'ET_AR est présent à la surface des cellules musculaires lisses⁷³, ET_BR est principalement localisé au niveau des cellules endothéliales et dans une moindre mesure est exprimé dans les cellules musculaires lisses et les macrophages^{73, 74}. Cette distribution n'est pas exhaustive, les récepteurs des ET étant présents dans de nombreux autres types cellulaires, comme indiqué **Figure 6**.

Type cellulaire	ET _A R	ET _B R	Rôle physiologique
Cellules endothéliales		+	Tonus vasculaire, clairance ET-1
Cellules musculaires lisses	+	+	Tonus musculaire, prolifération cellulaire
Myofibroblastes	+	+	Contractilité, synthèse matrice extracellulaire
Cardiomyocytes	+	+	Prolifération cellulaire, contraction, apoptose induite par l'hypoxie
Hépatocytes	+	+	Métabolisme hépatique
Cellules des tubules collecteurs rénaux		+	Réabsorption tubulaire
Neurones	+	+	Elongation des neurites, stress, apoptose
Ostéoblastes	+	+	Prolifération, différenciation, synthèse matrice extracellulaire
Kératinocytes	+	+	Prolifération, mélanogenèse
Adipocytes	+	+	Métabolisme

Figure 6. Expression des récepteurs des ET. D'après Khimji et Rockey, 2010²⁰.

2. 3. Modifications post-traductionnelles des récepteurs des endothélines

Les récepteurs aux ET sont sujets à diverses modifications post-traductionnelles dont la N-glycosylation, la palmitoylation et la phosphorylation. Celles-ci sont principalement localisées au niveau des domaines N-terminale et C-terminaux d'ET_AR et d'ET_BR (**Figure 5**).

Des sites de N-glycosylation ont été identifiés dans la partie N-terminale d'ET_AR et d'ET_BR^{75, 76}. Par ailleurs, des études de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence cinq sites potentiels de palmitoylation dans la queue C-terminale d'ET_AR et trois dans la queue C-terminale d'ET_BR⁷⁷⁻⁷⁹. Le degré de palmitoylation des récepteurs sur ces sites aurait une influence sur leurs couplages aux protéines G ainsi que sur les voies de signalisation déclenchées en aval, telles que l'activation de la phospholipase C (PLC) et des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) mais interviennent également dans l'ancrage de la queue C-terminale à la membrane^{77, 78, 80}. Enfin, 15 sites de phosphorylation ont été découverts pour ET_AR et 13 pour ET_BR, principalement localisés dans la queue C-terminale des récepteurs^{78, 79}. Ces phosphorylations peuvent notamment être réalisées par des kinases (les GRK) qui sont connues pour affecter le fonctionnement du récepteur. Nous reviendrons plus précisément sur ces phosphorylations dans la partie A. 3.

Toutes ces modifications post-traductionnelles des récepteurs aux ET sont autant de mécanismes de modulation de l'activité de ces récepteurs.

De plus, il a été montré qu'ET_BR était clivé à son extrémité N-terminale par une métalloprotéase entre les résidus R64 et S65 et que ce clivage serait dû à la liaison de l'agoniste ET-1. Les deux isoformes du récepteur obtenues sont conservées dans de nombreuses espèces⁸¹. Cependant, il semblerait que les formes entière et tronquée du récepteur soient également présentes après production d'ET_BR dans un système d'expression acellulaire, ceci indifféremment en présence ou en absence d'agoniste, ce qui met en doute l'hypothèse de clivage précédemment formulée⁸². Les auteurs ont de surcroît confirmé que la délétion observée se situait du côté N-terminal d'ET_BR.

2. 4. Dimérisation des récepteurs des endothélines

Comme c'est le cas pour de nombreux RCPG⁸³, ET_AR et ET_BR sont capables de former des dimères ou des oligomères (**Figure 7**) qui influenceraient la liaison du ligand ainsi que l'activation du récepteur, sa désensibilisation et la transduction du signal⁸⁴⁻⁸⁶. L'oligomérisation de ces récepteurs a été mise en évidence dans des systèmes de co-expression des récepteurs par des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET, toutefois cette dimérisation n'a pas été démontrée dans les cellules exprimant naturellement les récepteurs des ET.

La formation des dimères ne serait pas induite par le ligand mais serait constitutive^{84, 85, 87}. Une étude plus ancienne laissait penser que l'ET-1 pouvait ponter

entre eux ET_AR et ET_BR⁸⁸ cependant, la modélisation de la structure d'ET_BR réalisée par J. Lättig et ses collaborateurs va à l'encontre de cette théorie puisque le ligand viendrait se loger au cœur du récepteur¹⁹. Par ailleurs, il a été décrit qu'un motif PDZ présent en C-terminal d'ET_AR ainsi que les segments trans-membranaires 2 et 4 du récepteur seraient impliqués dans l'homodimérisation du récepteur et son hétérodimérisation avec ET_BR⁸⁶. L'homodimérisation d'ET_BR, tout comme la liaison d'ET-1, impliquerait quant à elle le premier segment trans-membranaire du récepteur⁸⁹. Les conséquences de la dimérisation d'ET_AR et d'ET_BR sur la signalisation en aval sont encore mal définies. Une étude reposant sur l'utilisation de peptides correspondant aux extrémités C-terminales des récepteurs, supposées être constituées de trois hélices α qui servent de point d'ancrage lors de la dimérisation, a permis d'élucider certains points. Alors que dans une lignée exprimant uniquement ET_AR l'expression du peptide correspondant à la troisième hélice d'ET_BR conduit à l'augmentation de la signalisation par ET-1, au contraire, dans les cellules exprimant exclusivement ET_BR, l'utilisation du même peptide a un léger effet antagoniste. La modélisation de la liaison semble indiquer que le peptide se lierait à la deuxième et à la troisième boucle intracellulaire d'ET_AR⁹⁰.

Diverses études ont mis en évidence l'existence de voies de signalisation croisées. En effet il a été démontré dans certains cas que l'utilisation d'un antagoniste spécifique d'ET_AR n'abolissait pas entièrement la contraction induite par le récepteur, mais qu'un antagoniste spécifique d'ET_BR était nécessaire à une relaxation totale des vaisseaux. Un antagoniste sélectif d'ET_AR et d'ET_BR pouvait lui aussi induire cette relaxation. Ces résultats vont dans le sens de l'interaction ET_AR/ET_BR^{91, 92}. Les effets de l'hétérodimérisation sur l'activité des récepteurs sont plus larges puisque l'internalisation plus lente de l'hétérodimère, en comparaison à celle d'ET_BR, pourrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes, ET_BR étant crucial à l'élimination d'ET-1 de la circulation.

Il a également été suggéré qu'ET_BR pouvait former des hétérodimères avec d'autres récepteurs comme le récepteur D₃ de la dopamine⁹³ et l'AT₁R de l'angiotensine⁹⁴ (**Figure 7**).

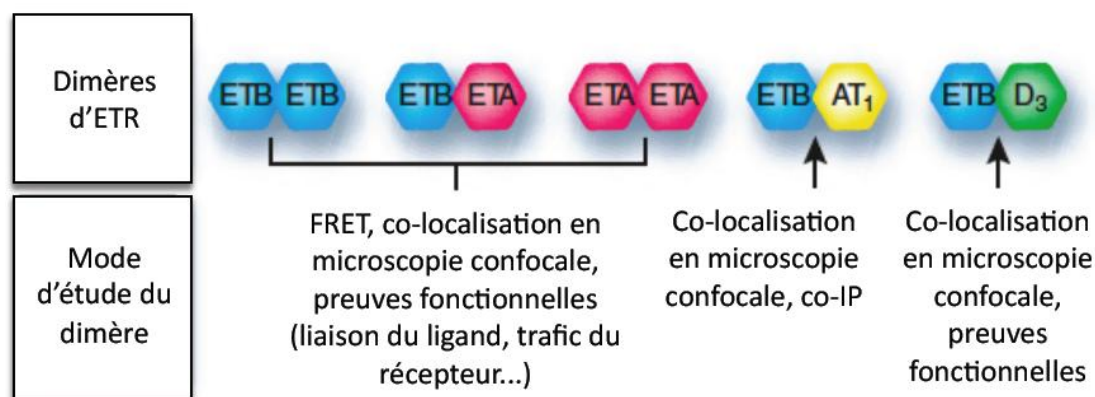


Figure 7. Résumé des différents dimères formés par ET_AR et ET_BR. Co-IP : co-immunoprécipitation ; FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Proposé par Boesen, 2008⁹⁵.

3. Signalisation de l'axe endothéline

3. 1. Voies de signalisation associées à l'axe endothéline (**Figure 8**)

La transmission du signal extracellulaire des ET aux cibles intracellulaires est extrêmement complexe : l'activation des récepteurs des ET aboutit en effet à divers processus cellulaires par l'interaction et la régulation d'un large réseau de protéines de signalisation. Aussi, le but de cette partie n'est pas d'apporter une vue exhaustive des voies de signalisation de l'axe endothéline, mais plutôt d'en souligner la richesse et la complexité. Une attention plus particulière sera ici portée aux voies PLC et MAPK ERK1/2 qui ont fait l'objet d'une partie de mes études.

a. Couplage de ET_AR et ET_BR aux protéines G

La liaison des ET à leurs récepteurs ET_AR et ET_BR (appartenant à la grande famille de RCPG) conduit à l'activation de nombreuses fonctions cellulaires médiées par des voies de signalisation complexes qui sont dépendantes ou indépendantes des protéines G hétérotrimériques. Les récepteurs des ET sont généralement décrits comme couplés aux protéines G G_q, G_i, G_{12/13} et plus rarement à G_s^{96, 97}. Le couplage de ET_AR et ET_BR aux protéines G met en jeu les boucles intracellulaires I2 et I3⁹⁸. Selon les modèles cellulaires, ce couplage est variable entre les deux récepteurs et peut être modulé par des modifications post-traductionnelles du récepteur, comme la palmitoylation⁹⁹.

La stimulation des récepteurs aux ET peut également causer l'activation de voies de signalisation indépendantes des protéines G, mais dépendante de la β-arrestine

(β -arr)^{100, 101}.

b. Couplage des récepteurs des ET à la voie PLC

ET_AR et ET_BR, via leur couplage à G_q/G₁₁ ou à G_i, activent les PLC β . Cette voie de signalisation conduit à la formation d'inositol trisphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂). L'IP₃ active des récepteurs canaux qui lui sont spécifiques, localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique. La liaison de l'IP₃ à ses récepteurs induit leur ouverture, ce qui conduit à la libération du calcium stocké dans le réticulum vers le cytosol. Cette augmentation rapide du Ca²⁺ cytosolique est impliquée dans la régulation des activités enzymatiques de nombreuses enzymes, en particulier les différentes kinases associées à la contraction des cellules musculaires lisses^{102, 103}. Par ailleurs, le DAG est un activateur de la PKC¹⁰⁴. En effet, le DAG, conjointement au Ca²⁺ et à la phosphatidylsérine (PS), active les protéines kinases C (PKC)^{105, 106}, une famille de kinases à activité Ser/Thr possédant un très grand nombre de substrats. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), l'activation de la PKC par l'ET-1 participe à la régulation de la synthèse protéique¹⁰⁷, de la prolifération cellulaire^{108, 109} et de la contraction¹¹⁰.

c. Couplage des récepteurs des ET aux GTPases de la famille Rho

Les récepteurs des ET, via leur couplage aux protéines G G₁₂/G₁₃, sont capables d'activer les petites protéines G de la famille Rho dont les principaux représentants sont RhoA, Rac et CDC42. L'activation de ces petites GTPase se fait par l'intermédiaire de facteurs d'échange nucléotidiques spécifiques de cette classe de protéines G appelés RhoGEF. Certaines formes de RhoGEF, comme p115RhoGEF, interagissent et sont activées par les protéines G G₁₂ et G₁₃¹¹¹. Une fois activé, RhoGEF catalyse l'échange du GDP/GTP au niveau de la protéine G de type Rho, ce qui conduit à son activation. Ces GTPases de la famille Rho ont pour rôle majeur de contrôler le fonctionnement du cytosquelette d'actine et les diverses fonctions qui lui sont associées telles que la contraction, l'adhésion et la migration cellulaire¹¹². Cette régulation fait intervenir plusieurs protéines kinases dont la *RhoKinase* (ROCK) qui est activée par RhoA ou la *P21 Activated protein Kinase* (PAK) activée par Rac et CDC42.

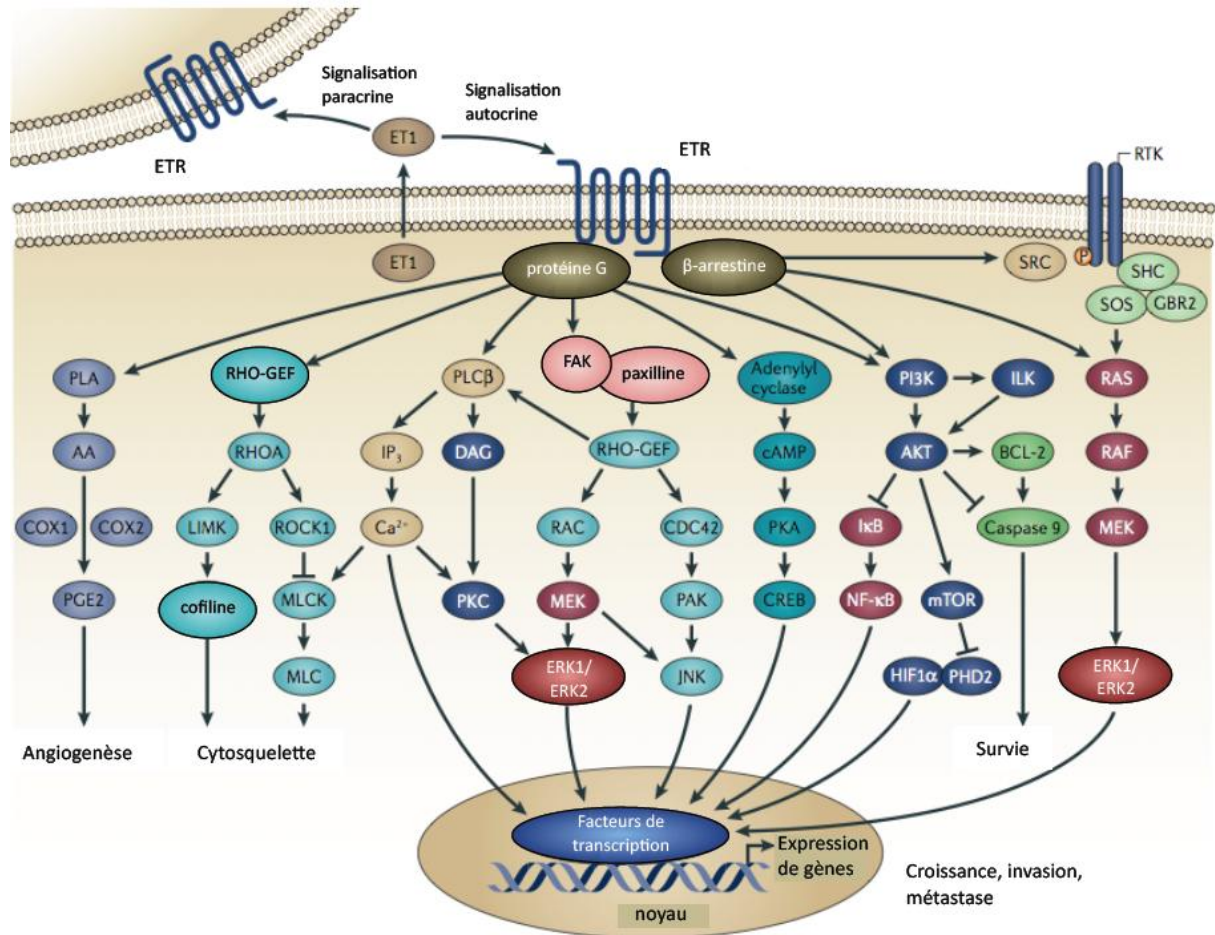


Figure 8. Signalisation de l'axe endothéline. Les récepteurs des ET se couplent à différentes protéines G, ainsi qu'à des protéines d'échafaudage comme les β -arrestines. Différentes voies de signalisation sont ainsi activées. Ces récepteurs sont également impliqués dans des phénomènes de transactivation, via des RTK. AA : acide arachidonique ; cAMP : *cyclic AMP* ; COX1/2 : cyclooxygénase 1 et 2 ; CREB : *cAMP-responsive element-binding* ; DAG : diacylglycérol ; FAK : *focal adhesion kinase* ; GRB2 : *growth factor receptor-bound 2* ; HIF1 α : *hypoxia-inducible factor 1 α* ; I κ B : *NF- κ B inhibitor* ; ILK : *integrin-linked kinase* ; IP₃ : inositol triphosphate ; JNK : *JUN N-terminal kinase* ; LIMK : *LIM domain kinase* ; MLC : *myosin light chain* ; MLCK : *MLC kinase* ; NF- κ B : *nuclear factor- κ B* ; PAK : *p21-activated kinase* ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PHD2 : *prolyl hydroxylase 2* ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PLA : phospholipase A ; PLC β : phospholipase C β ; PtdIns(4,5)P₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; RHOA : *RAS homology A* ; RHO-GEF : *RHO-guanine nucleotide exchange factor* ; ROCK1 : *RHO-associated coiled-coil containing protein kinase 1* ; RTK : *receptor tyrosine kinase* ; SHC : *SRC homology 2 domain-containing*. Proposé par Rosano et al., 2013¹¹³.

d. Couplage des récepteurs des ET à la voie adénylyl cyclase (AC)

Les AC sont des enzymes qui, à partir de l'ATP, produisent de l'AMP cyclique (AMPC), second messenger qui, via la PKA (pour protéine kinase A) ou la protéine Epac (pour *Exchange protein directly activated by cyclic AMP*), est impliqué dans la régulation de multiples fonctions cellulaires. L'activité des AC est régulée par les sous-unités des protéines G (α_s , α_i ou le dimère $\beta\gamma$). ET_AR et ET_BR sont généralement

couplés via G_i à l'inhibition des AC. Cette voie favorise la contraction des muscles lisses par ET-1¹¹⁴. La stimulation des AC par les ETR a été décrite¹¹⁵⁻¹¹⁸. Généralement la production d'AMP cyclique par les ET ne résulte pas du couplage direct d'ETR à G_s , mais à la production d'un médiateur dont le récepteur est couplé à G_s . En effet, des études^{119, 120} suggèrent que l'ET-1 stimule la production des prostaglandines, dont les récepteurs, via G_s , stimulent la production d'AMPc. Ce même mécanisme est également fonctionnel dans les cellules musculaires lisses pulmonaires et l'AMPc produit est impliqué dans la régulation des gènes dont l'expression est dépendante de CRE (pour *Cyclic AMP Responsive Element*)¹²¹.

e. ET et le signal calcique

Le calcium joue un rôle important en contribuant au contrôle des fonctions cellulaires impliquées dans la prolifération, la contraction, la migration, la survie et l'angiogenèse. Sa concentration intracellulaire est régulée par les récepteurs membranaires (RCPG et RTK, pour récepteurs à activité tyrosine kinase) qui déclenchent différents mécanismes. ET-1 est un excellent contracturant des muscles lisses grâce à la grande diversité des voies mises en jeu, parmi lesquelles l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). ET-1 augmente $[Ca^{2+}]_i$ via l'activation de la voie PLC (A. 3. 1. b.), mais aussi via les canaux voltage-dépendants (VOC) et indépendants (TRP), par échangeur Na^+/H^+ , les canaux ROC (*receptor-operated Ca^{2+} channel*)¹²².

f. ET et monoxyde d'Azote (NO)

Le NO participe à de nombreuses fonctions, en particulier il intervient dans la régulation du tonus vasculaire mais également dans la signalisation neuronale et dans les mécanismes de défense immunitaire²⁰. Dans le système vasculaire, au niveau des cellules endothéliales, ET-1, via ET_B R, active la *NO-Synthase* (eNOS), augmentant la libération du NO^{123, 124}. NO, au niveau musculaire, active le groupement hème de la guanylate cyclase soluble, induisant la production de GMP cyclique (GMPC) qui provoque une réduction en $[Ca^{2+}]_i$ et l'activation de la protéine kinase G (PKG). Activée, la PKG phosphoryle la sous-unité régulatrice de la myosine phosphatase (MYPT1) qui à son tour inhibe la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et provoque ainsi l'arrêt du cycle de l'actomyosine et donc la relaxation des cellules musculaires lisses (CML)²⁰. Par ailleurs, le NO semble avoir un effet inhibiteur sur la synthèse d'ET-1, en inhibant la transcription de la prépro-ET-1²⁰.

g. Voie des MAP kinases

La famille des MAPK

Cette famille est composée de 4 sous-familles : ERK1 /2 (MAPK3/1), p38 (MAPK11-14), JNK (MAPK 8-10) et ERK5 (Big MAPK1 ou MAPK7) (**Figure 9**). Les membres de cette grande famille sont des Ser/Thr kinases impliquées dans la régulation de facteurs de transcription et dans la phosphorylation de protéines et enzymes du cytoplasme et du noyau. Les MAPK interviennent dans la prolifération, la survie, l'apoptose, la différenciation, la migration ou encore l'inflammation. Elles sont activées par une myriade de stimuli incluant hormones, facteurs de croissance, stress, cytokines... Leur activation est consécutive à une double phosphorylation au niveau d'un motif Thr-X-Tyr situé dans leur boucle d'activation.

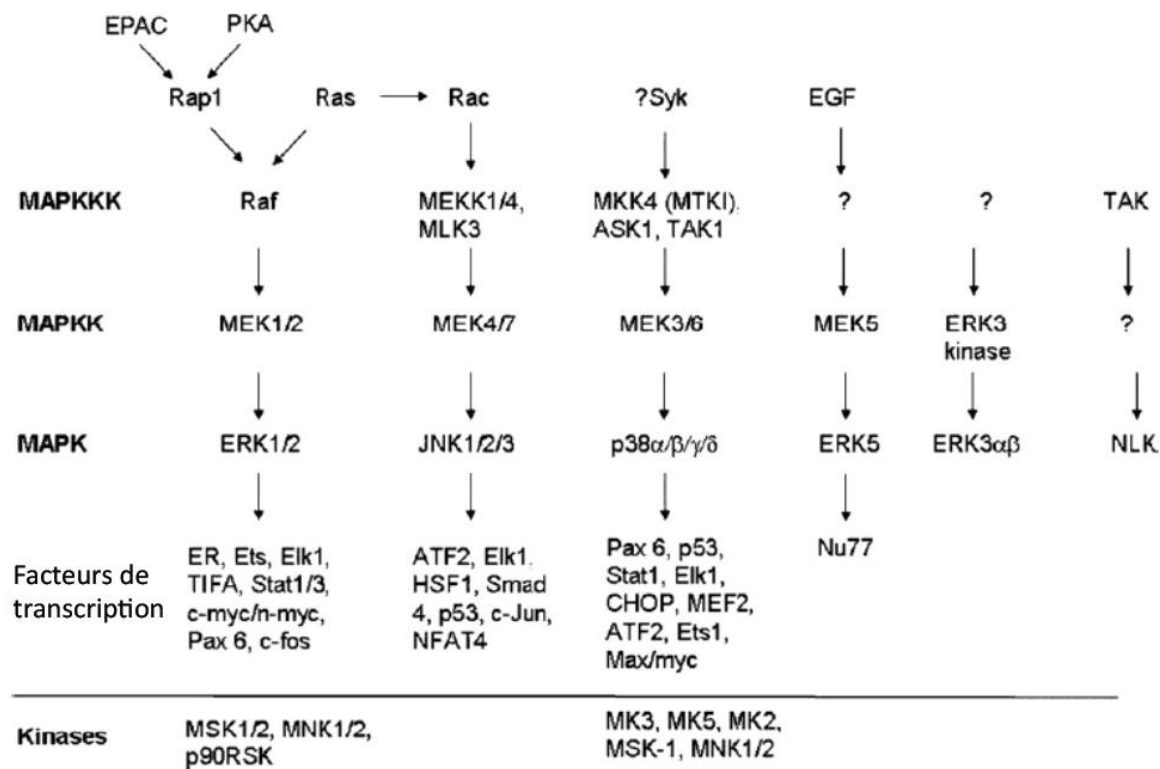


Figure 9. Voies MAPK activées par ET-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Proposé par Ivey *et al.*, 2008¹²⁵.

Le module ERK1/2

Cette voie de signalisation est la première à avoir été élucidée et elle est une des plus étudiées¹²⁶. Elle joue un rôle important dans la transmission de divers stimuli extracellulaires puisqu'elle se trouve activée en aval de RCPG, de RTK et également de canaux ioniques et permet l'intégration de ces différents stimuli.

L'initiation de la cascade de signalisation des MAPK ERK1/2 commence généralement par l'activation de la GTPase monomérique, Ras. Quatre isoformes de Ras sont décrites : H-Ras, N-Ras, K-Ras4A et K-Ras4B¹²⁷. Lorsqu'elle est activée, Ras recrute à la membrane la MAPKKK (ou MAP3K) Raf (Raf-1, B-Raf, A-Raf) où elle va être activée par phosphorylation. L'activation de Raf est un phénomène complexe pouvant faire intervenir différentes protéines kinases comme la PKC, Src, PAK (pour *p21-activated kinase*) et la protéine kinase B (akt) mais aussi son interaction avec d'autres protéines telles que KSR (pour *kinase suppressor of Ras*) ou RKIP (pour *raf kinase inhibitory protein*)¹²⁸. Une fois activée, Raf active la MAPKK MEK1/2 en la phosphorylant sur deux résidus sérine. MEK1/2 fait partie de la famille des protéines kinases à double spécificité, caractérisée par une double activité Ser/Tyr kinase, par opposition à la majorité des protéines kinases qui sont soit des Ser/Thr kinases soit des Tyr kinases. A leur tour MEK1/2 phosphorylent ERK1/2 sur les résidus Thr/Tyr contenus dans le motif TEY situé dans leur boucle d'activation. Cette double phosphorylation est nécessaire au maintien d'une configuration stable du domaine kinase¹²⁹. ERK1/2, qui sont des Ser/Thr kinases, peuvent ensuite transmettre des signaux en phosphorylant, de façon spécifique, de très nombreuses protéines, de nature cytoplasmique, nucléaire, et même localisées dans les organelles¹³⁰ (**Figure 10**). ERK peut par exemple réguler RSK, MNK1/2, TSC2 et cPLA₂ dans le cytosol. Les kinases ERK peuvent également être transloquées dans le noyau où elles phosphorylent un ensemble de facteurs de transcription tels que ELK-1, c-Fos et c-Myc, associés à la prolifération cellulaire ou à d'autres fonctions physiologiques ou pathologiques¹³⁰.

ET-1 active les MAPK ERK1/2 dans les CMLV par une signalisation indépendante de la protéine tyrosine kinase Src et du Ca²⁺, mais dépendante de Ras et Raf et de la PI3K^{131, 132}. Au contraire, dans d'autres types cellulaires la signalisation Src/Ca²⁺ est indispensable⁸⁰. Dans les cellules musculaires lisses utérines de rate, la PI3K contribue à l'activation de ERK1/2 par le récepteur ET_AR¹³³, alors que dans les cellules de léiomyome utérin, la PI3K n'intervient pas^{134, 135}. Ces résultats soulignent une fois de plus la grande variabilité de signalisation entre différentes cellules, en réponse à un même stimulus.

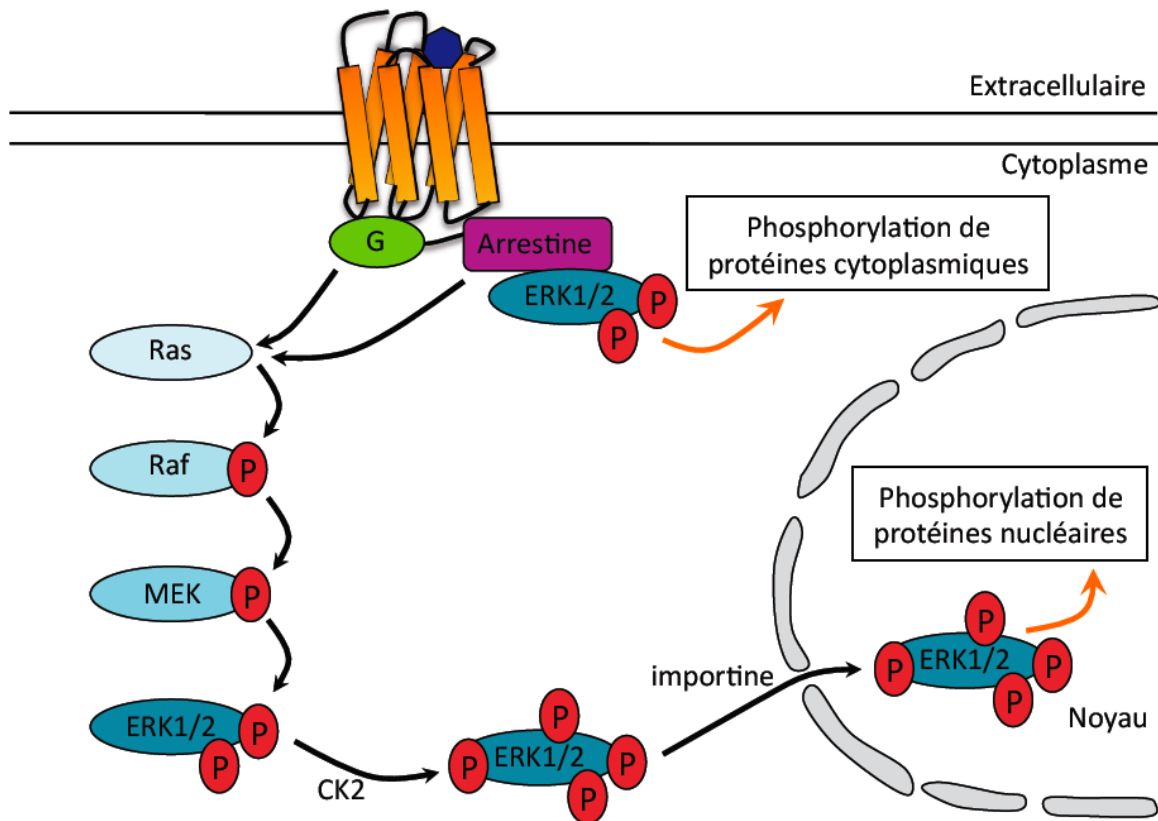


Figure 10. Activation de la voie ERK1/2. La distribution subcellulaire de ERK1/2 varie en fonction de leur mode d'activation : ERK1/2 phosphorylés par l'intermédiaire de protéines G sont transférés au noyau, tandis que ERK1/2 activés via les β -arrestines (β -arr) (rôle de protéine d'échafaudage) présentent une localisation majoritairement cytoplasmique. Protéine kinase CK2 : caséine kinase II. D'après Eishingdrelo et Kongsamut, 2013¹³⁰.

h. ETR et la transactivation des RTK

La signalisation de l'axe endothéline est rendue encore plus complexe par l'existence de voies de signalisation croisées. Diverses études ont en effet mis en évidence l'existence de « *cross-talk* » ou communications entre les deux récepteurs des ET dans la circulation systémique et les muscles lisses non vasculaires⁹¹. De surcroît ET_AR et ET_BR, comme d'autres RCPG, sont capables de transactiver des RTK^{136, 137}. Historiquement, ce type de transactivation a pour la première fois été mis en évidence en 1996 lorsque A. Ulrich et ses collaborateurs ont découvert que l'angiotensine II induisait la phosphorylation d'un RTK, le récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), et la phosphorylation de ERK1/2 en aval¹³⁶. Ce type de signalisation croisée a été observé dans différents types cellulaires. C'est la tyrosine kinase Src qui permet la transactivation de RTK tels que l'EGFR¹³⁸ et le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) VEGFR3¹³⁹. Une étude a montré qu'une deuxième phase d'activation des ERK1/2

induite par ET-1 dépendait de G_i et de l'activation d'une métalloprotéase et du récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*)¹⁴⁰. La transactivation d'EGFR a également été observée via l'activation par ET-1 de la protéase ADAM17, qui clive le précurseur membranaire de l'EGF pour produire de l'EGF soluble, qui va activer son récepteur, l'EGFR¹⁴¹.

Ces processus de transactivation dans la voie de ERK occupent une place importante dans les cancers, nous y reviendrons par la suite.

i. ETR et protéines d'interaction autres que les protéines G

Il est à présent largement admis que l'interaction physique et fonctionnelle des RCPG ne se cantonne pas aux protéines G mais s'étend à un ensemble d'autres protéines appelées *GPCR-interaction proteins* (GIP). Les GIP conduisent les RCPG à activer des voies de signalisation indépendamment de leur couplage aux protéines G. L'oligomérisation des RCPG, traitée plus en amont (A. 2. 4.), souligne d'ailleurs l'existence de domaines d'interaction protéine-protéine tel que le domaine PDZ, présent en région C-terminale. Ces GIP qui régulent le trafic, la signalisation, la pharmacologie et la désensibilisation des récepteurs jouent un rôle important dans la formation de grands complexes fonctionnels appelés « réceptosomes »¹⁴².

La *Jun activation domain binding protein 1* (Jab1) a par exemple été identifiée comme partenaire des récepteurs des ET. Cette protéine interagit avec l'extrémité C-terminale des récepteurs ET_AR et ET_BR et induit leur ubiquitination et leur dégradation¹⁴³. Cet effet de Jab1 a pour conséquence de réduire l'activation des MAP kinases ERK1/2 en réponse à ET-1.

Parmi les GIP, les β -arr sont les plus étudiées. L'activation d'un RCPG induit la translocation de la β -arr du cytoplasme vers la membrane plasmique, où elle interagit avec le récepteur suite à la phosphorylation de celui-ci par des protéines kinases (PKC, PKA ou GRK), conduisant à son découplage des protéines G¹⁴⁴. S'en suit l'internalisation du récepteur, détaillée en A. 3. 2. Si les β -arr ont dans un premier temps été décrites pour leurs propriétés de désensibilisation et d'internalisation du récepteur, on sait aujourd'hui qu'elles remplissent également un rôle important dans la médiation du signal puisqu'elles jouent un rôle de protéines échafaudage, impliquées dans l'organisation de complexes signalétiques sophistiqués, notamment dans le cas de la voie des MAPK¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. De plus, des expériences de migration cellulaire ont montré que l'expression de la β -arr2 était essentielle à la migration de CML aortiques de rat, aspect fondamental du remodelage vasculaire par ET-1/ET_AR¹⁴⁸. Ces

résultats montrent bien que les β -arr sont des acteurs à part entière de la signalisation. Elles sont en effet également impliquées dans les phénomènes de transactivation des RTK décrits plus haut et il a été montré qu'elles intervenaient dans l'activation de la voie β -caténine par ET-1¹⁴⁹. Par ailleurs, la β -arr est requise pour l'activation de NF- κ B par ET-1/ET_AR dans les cellules ovariennes cancéreuses¹⁵⁰.

L'interaction physique et fonctionnelle des β -arr avec les RCPG (indépendamment des protéines G) a ouvert une nouvelle voie pour la pharmacologie des RCPG et l'émergence de la notion de ligands dits biaisés. Ces ligands sont des agonistes ou des antagonistes capables de moduler sélectivement les effets dépendants ou indépendants des protéines G induits par des RCPG. Une seule étude suggère l'existence de ligands biaisés pour les récepteurs ET. Dans cette étude le bosentan semble se comporter comme un antagoniste biaisé non compétitif vis-à-vis du recrutement de la β -arr par ET_AR¹⁴⁷. Toutefois, cette conclusion semble contradictoire avec le fait que le bosentan est par ailleurs décrit comme un antagoniste compétitif pour la liaison de l'ET-1 au récepteur ET_AR.

3. 2. Internalisation et désensibilisation des récepteurs des endothélines

L'internalisation, le recyclage et la dégradation sont autant de processus qui permettent une régulation fine de la signalisation des RCPG d'un point de vue temporel comme spatial. En effet, la désensibilisation d'un RCPG, suite à la liaison de son ligand, est un processus indispensable pour éviter une sur-stimulation qui entraînerait des dommages irréversibles pour la cellule. Par ailleurs il est important que les récepteurs soient sensibles à des stimuli faibles, les concentrations en ligand circulant étant la plupart du temps extrêmement réduites.

On distingue trois voies d'internalisation distinctes pour les RCPG : une voie dépendante de la clathrine¹⁵¹ ; une voie dépendante de la cavéoline¹⁵² ; une voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline. Dans le cas des récepteurs des ET, la voie la plus décrite est la voie dépendante de la clathrine. Sous l'effet de la liaison des ET, ET_AR et ET_BR se trouvent rapidement internalisés par un processus mettant en jeu différents partenaires. Il s'agit de la famille des *G protein-coupled receptor kinases* (GRK), des β -arr (les arrestines 2 et 3, respectivement appelées β -arr1 et β -arr2), de la dynamine et de la clathrine.

Ce processus d'internalisation des RCPG a été largement décrit, notamment dans

le cas du récepteur β_2 -adrénergique¹⁵³. Le RCPG occupé par son agoniste est phosphorylé de façon spécifique sur des résidus sérine et thréonine par les GRK (**Figure 11**). N.J. Freedman et ses collaborateurs ont démontré, entre autres par des expériences de co-immunoprécipitation, que les ETR étaient préférentiellement phosphorylés par GRK2¹⁵⁴, qui bloquerait la protéine G avant de phosphoryler le récepteur¹⁵⁵. La phosphorylation du récepteur peut également être due à l'action d'une PKC ou d'une PKA¹²⁵. La phosphorylation du récepteur conduit à la liaison et à l'activation des β -arr. Il semblerait qu'ET_AR soit préférentiellement désensibilisé par la β -arr2¹⁴⁸. Ainsi, le récepteur se trouve stériquement découplé de sa protéine G et dirigé vers les puits recouverts de clathrine (*clathrine-coated pits*, CCP)¹⁵⁶.

Les récepteurs ET_AR et ET_BR internalisés sont dirigés vers les endosomes précoces avant de poursuivre des voies intracellulaires différentes¹⁵⁷. Ces endosomes précoces sont discriminables par les marqueurs Rab5 et EEA1 (pour *early endosome antigen 1*). Contrairement à ET_AR, ET_BR est ensuite dirigé vers les endosomes tardifs, puis vers les lysosomes de dégradation^{157, 158} (**Figure 11**). Cette voie de dégradation d'ET_BR et de son ligand, comme nous l'avons vu précédemment, constitue une voie importante dans la clairance de l'ET-1. En effet, on estime que 80% de l'ET-1 circulant dans les poumons y est retenue et éliminée par endocytose d'ET_BR^{55, 159}. Au contraire, ET_AR est lui dirigé vers les endosomes de recyclage¹⁵⁷. Des études supplémentaires de mutagenèse, consistant à remplacer la queue C-terminale d'un récepteur par l'autre, ont permis de mettre en évidence que le signal de recyclage d'ET_AR se trouvait dans cette portion du RCPG¹⁶⁰. Plus précisément, le recyclage du récepteur serait possible grâce à un domaine PDZ¹⁶¹. L'absence de ce motif chez ET_BR expliquerait que le récepteur suive une voie de dégradation suite à son internalisation.

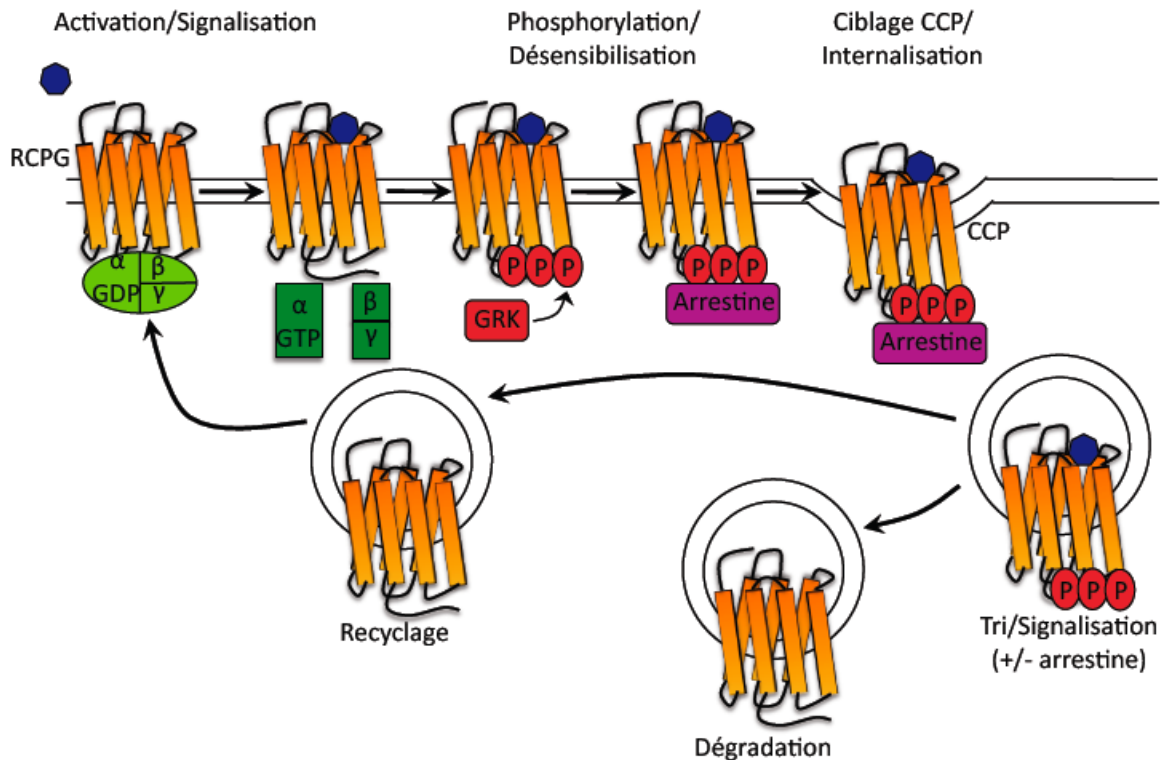


Figure 11. Régulation de l'endocytose d'un RCPG médiée par l'arrestine. La liaison de l'agoniste (en bleu) au RCPG induit l'activation du récepteur, le couplage de la protéine G (en vert) et l'initiation de la signalisation. La phosphorylation par la GRK (*G protein-coupled receptor kinase*) de domaines intracellulaires du récepteur activé provoque le recrutement de l'arrestine. Les complexes RCPG/arrestine sont dirigés vers les puits recouverts de clathrine (CCP) où ils sont internalisés. Le récepteur internalisé est ensuite recyclé à la membrane ou dégradé.

Il a été suggéré dans le paragraphe concernant la dimérisation des récepteurs que l'hétérodimérisation ET_AR/ET_BR pourrait avoir des conséquences physiologiques importantes. Comme cela a pu être décrit pour d'autres hétérodimères de récepteurs, ET_BR est internalisé plus lentement sous forme d'hétérodimère que lorsqu'il se trouve sous forme de monomère, la vitesse d'internalisation étant celle du plus lent des deux partenaires, ici ET_AR⁸⁴. En effet, il a auparavant été observé qu'ET_BR était rapidement phosphorylé et qu'ET_AR était lentement internalisé¹⁶². Bien que les voies intracellulaires empruntées par l'hétérodimère soient peu étudiées, B. Gregan et ses collaborateurs ont montré que le complexe n'était pas dissocié avant internalisation. On peut donc aisément imaginer en cas de recyclage des récepteurs que le nombre d'ET_BR fonctionnels à la surface de la cellule soit modifié et ainsi que la clairance d'ET-1 en soit affectée.

Une autre voie d'internalisation d'ET_BR a été récemment mise en évidence par P. Oh et ses collaborateurs : ET_BR se trouverait à la surface des cellules endothéliales dans des zones riches en cavéoles. Des expériences *in vitro* montrent que la

stimulation par l'ET induit un bourgeonnement et une internalisation rapide des cavéoles, inhibée par l'utilisation de l'inhibiteur spécifique d'ET_BR, le BQ788¹⁶³. Par ailleurs, ce phénomène n'a pas été observé pour ET_AR.

4. Rôles physiologiques et physiopathologiques de l'axe endothéline

Très rapidement après la découverte des ET, des études ont porté sur les rôles physiologiques et physiopathologiques de ces peptides dans le système vasculaire, et plus particulièrement sur le rôle d'ET-1, connu pour être le plus puissant vasoconstricteur chez l'homme. C'est ainsi que les vaisseaux, le muscle cardiaque, les voies respiratoires et les reins (**Figure 12**) ont fait l'objet d'études diverses portant sur l'axe endothéline et sont impliqués dans l'hypertension et les pathologies y étant liées.

4. 1. Rôle de l'axe endothéline dans le tonus vasculaire

Il est actuellement largement admis que l'ET-1, peptide vasoconstricteur, joue un rôle important dans l'homéostasie vasculaire mais également dans diverses pathologies vasculaires. Etant le seul peptide de la famille des ET identifié dans les vaisseaux, ET-1 est sécrété par les cellules endothéliales mais également par les CMLV dans des conditions inflammatoires^{7, 164}. Au niveau de la paroi vasculaire, la concentration locale en ET-1 est 100 fois plus élevée que celle du plasma, ceci étant en grande partie dû au fait que 80% de l'ET-1 est sécrétée du côté basal des cellules endothéliales⁴¹. ET-1 se lie à ET_AR présent à la surface des CML, sous-jacentes aux cellules endothéliales, ayant ainsi une action paracrine. Le peptide se lie également à ET_BR sur les cellules endothéliales, exerçant une action autocrine sur celles-ci, et dans une moindre mesure sur les CML^{56, 57}, celles-ci exprimant moins d'ET_BR. Le ratio ET_AR:ET_BR à la surface des CML varie en fonction du type de vaisseau rencontré. De façon générale, la valeur du ratio est moindre pour les veines que pour les artères¹⁶⁵. Toutefois, dans certaines pathologies vasculaires on a pu noter une augmentation du niveau d'expression d'ET_BR dans les CML¹⁶⁶. L'administration intraveineuse d'ET-1 entraîne un phénomène biphasique : une vasorelaxation transitoire, qui dure jusqu'à quelques minutes, suivie d'une vasoconstriction maintenue jusqu'à 1 heure¹⁶⁷ (**Figure 13**). La vasorelaxation précoce est due à l'activation d'ET_BR à la surface des

cellules endothéliales, ce qui provoque la libération de NO et de prostacycline¹⁶⁸. La vasoconstriction soutenue qui suit est, elle, due à l'activation d'ET_AR exprimé dans les CML et à la mobilisation du calcium intra et extracellulaire via l'activation de la PLC¹⁶⁹. De plus, en activant ET_AR, les ET induisent la croissance et la prolifération des cellules des muscles lisses. Ces effets cellulaires font intervenir les MAPK et la transactivation d'EGFR¹⁷⁰. L'utilisation d'antagonistes a permis d'étudier de façon plus précise l'intervention de l'ET dans le maintien de la pression sanguine basale, processus plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, le fait de bloquer ET_AR ne produit qu'une très faible ou pas de diminution de la pression artérielle moyenne¹⁷¹, suggérant que ce sous-type de récepteur ne joue qu'un rôle limité dans la normalisation du tonus vasculaire chez des individus sains. Au contraire lorsqu'ET_BR se retrouve bloqué, la pression artérielle augmente¹⁷², d'une part probablement par le biais d'ET_AR et d'autre part par l'absence de production de NO. ET_BR jouerait donc un rôle plus important dans le maintien de la pression sanguine basale et dans le tonus vasculaire qu'ET_AR, protégeant ainsi le système vasculaire des effets vasoconstricteurs puissants de l'ET endogène. Des études menées sur des souris invalidées pour l'ET-1 dans les cellules endothéliales ont mis en évidence le rôle du peptide dans la régulation de la pression sanguine. Ces souris dépourvues d'ET-1 dans les cellules endothéliales présentent une réduction des pressions systolique et diastolique par rapport aux animaux du groupe contrôle. Les auteurs ont confirmé par des expériences supplémentaires, en utilisant des inhibiteurs de l'axe angiotensine et du système sympathique, que cet effet était directement imputable à l'interaction entre les cellules endothéliales et les CML via l'ET-1¹⁷³. Une invalidation spécifique à un tissu d'ET_AR et d'ET_BR apporterait une meilleure compréhension du système endothéline dans le tonus vasculaire.

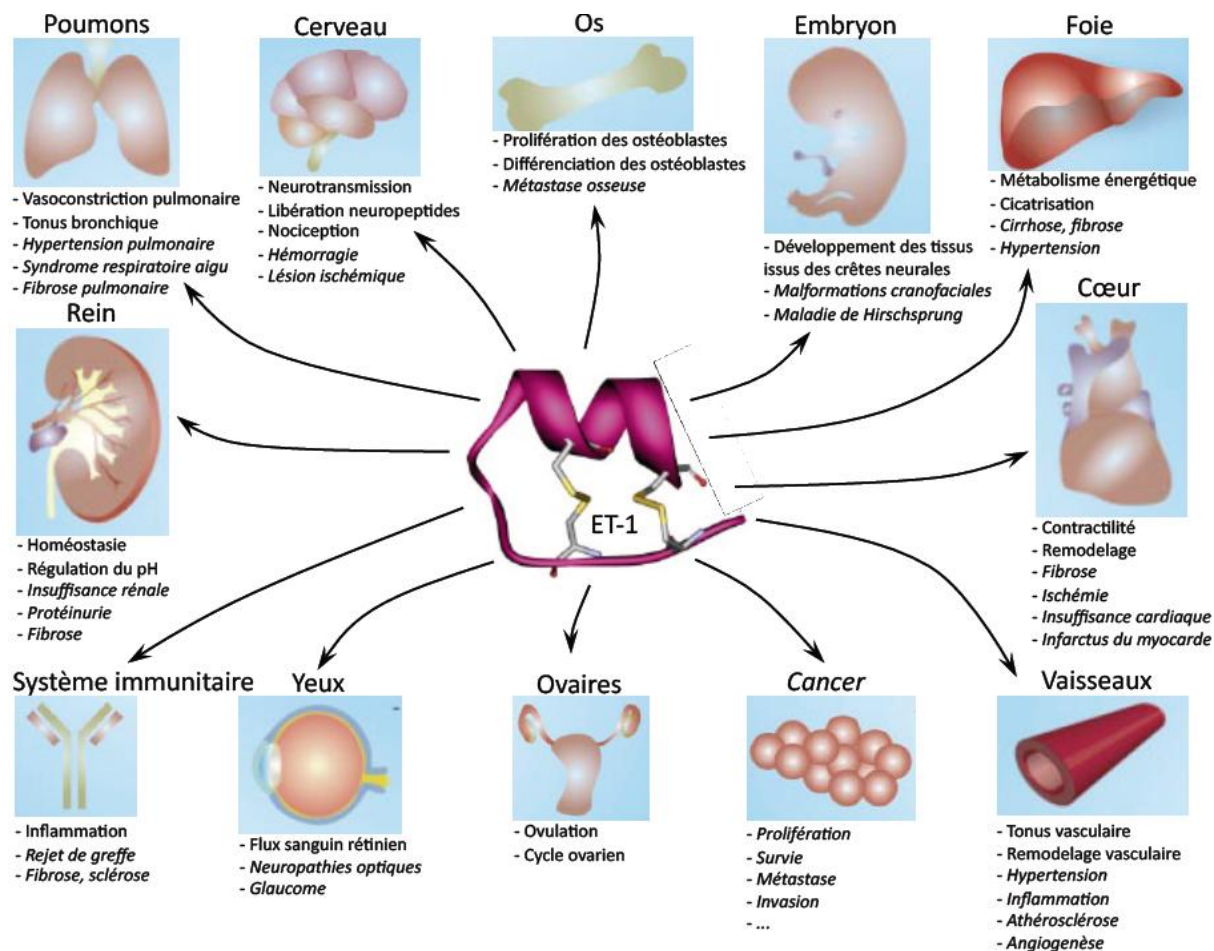


Figure 12. Principaux rôles physiologiques et pathologiques de l'ET-1. L'axe endothéline remplit des rôles physiologiques variés. Son dysfonctionnement est impliqué dans de nombreuses pathologies. D'après Stow *et al.*, 2011³⁸

A la lumière des rôles physiologiques remplis par l'axe endothéline sur les vaisseaux, son implication dans l'hypertension a rapidement été soulevée. La plupart des patients souffrant d'hypertension ne présentent pas de concentrations plasmatiques actives d'ET^{174, 175}. Deux cas rapportés d'hémangioendothéliome associés à une concentration élevée en ET-1 et à une pression sanguine forte font exception. L'exérèse de la tumeur a conduit à un retour à la normale¹⁷⁴. Cependant, un mécanisme de dérégulation locale d'ET-1 est envisageable dans l'élévation de la pression sanguine puisque les patients souffrant d'hypertension associée à une insuffisance rénale ou à une maladie vasculaire ont des concentrations plasmatiques en ET-1 dix fois plus élevées que la normale¹⁷⁴. Dans ces cas, ceci pourrait être lié à une diminution de la clairance locale et/ou une augmentation de la production locale du peptide vasoactif. Par ailleurs, des expériences menées sur des modèles de rats présentant une hypertension sensible au sel apportent des arguments supplémentaires quant à l'implication de l'ET dans l'hypertension, puisque ces animaux sont sensibles à des traitements par un antagoniste d'ET_AR^{176, 177}. Des études

plus récentes, notamment des essais cliniques chez l'homme viennent confirmer ces résultats préliminaires obtenus chez l'animal.

En plus de son rôle dans la normalisation du tonus vasculaire, et donc dans l'hypertension, le système endothéline est impliqué dans d'autres pathologies vasculaires. Parmi elles on compte les vasospasmes cérébraux consécutifs à une hémorragie sous-arachnoïdienne et l'athérosclérose. En cas de vasospasme cérébral, la libération d'ET-1, due à l'inflammation, provoque une importante vasoconstriction des vaisseaux sanguins alimentant le cerveau. Chez les patients souffrant d'hémorragie sous-arachnoïdienne associée à des vasospasmes cérébraux, la concentration plasmatique en ET-1 est augmentée¹⁷⁸. Le système endothéline joue également un rôle crucial dans l'athérosclérose. En effet, dans cette maladie, les cellules endothéliales et les macrophages sont à l'origine d'une libération d'ET-1 qui active ET_AR présent à la surface des macrophages, des CML et des fibroblastes. L'ET-1 libérée a des effets mitogènes sur les CML et les fibroblastes et stimule la synthèse de médiateurs de l'inflammation dans les macrophages et de fibronectine par les CML¹⁷⁹⁻¹⁸². Les ET, via ET_AR stimuleraient également le stress oxydatif dans le système vasculaire¹⁸³. Il a été observé qu'un traitement avec des lipoprotéines de basse densité (*low density lipoprotein*, LDL) oxydées, facteur bien connu de l'athérosclérose, stimulait la synthèse de l'ET-1 à la fois dans les cellules endothéliales humaines et dans les macrophages^{184, 185}. De plus, une étude a montré que chez des lapins nourris avec un régime riche en cholestérol, la concentration en ET-1 dans les tissus de l'arc aortique présentant des lésions athéroscléreuses est augmentée de six fois¹⁸⁶. Par ailleurs, la présence d'ETR dans les plaques d'athérosclérose a été confirmée chez l'homme par des expériences de liaison du ligand radiomarqué¹⁸⁷. L'utilisation d'antagonistes d'ET_AR dans des modèles précliniques a montré son efficacité dans le retardement du développement de la maladie et a permis de mettre en évidence le rôle de l'axe ET-1/ET_AR dans la réponse ischémique au stress dans l'athérosclérose¹⁸⁸. Plus récemment, le rôle d'ET-1 dans la progression de l'athérosclérose a été confirmé : l'ET-1 réduirait la quantité de lipoprotéines à haute densité (*high density lipoprotein*, HDL) et augmenterait le stress oxydatif et l'inflammation dans les lésions athéroscléreuses¹⁸⁹. La synthèse du *connective tissue growth factor* (CTGF), un médiateur pro-fibrotique surexprimé dans les plaques d'athérosclérose, serait de plus stimulée par l'ET-1 via ET_AR et Rho¹⁹⁰.

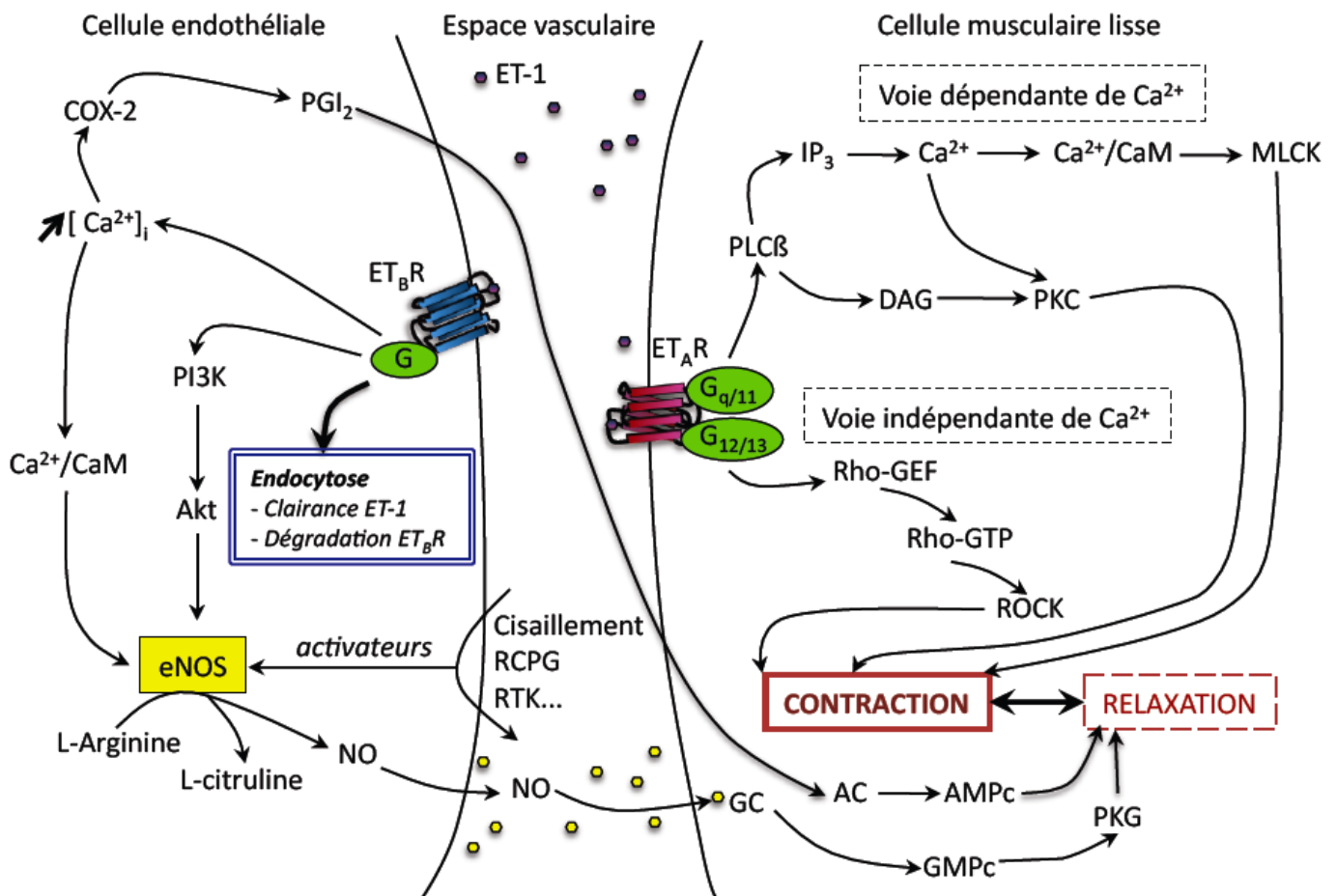


Figure 13. Régulation du tonus vasculaire par l'axe endothéline. $ET_B R$ exprimé à la surface des cellules endothéliales contrôle le tonus vasculaire via la libération de vasodilatateurs, NO et PGI_2 . Dans les cellules musculaires lisses, NO entraîne la production de GMP cyclique (GMPc) qui conduit à l'activation de la protéine kinase G (PKG) et à la relaxation cellulaire. De plus, l'élimination d'ET-1 par endocytose d' $ET_B R$ prévient la stimulation excessive d' $ET_A R$ présent à la surface des cellules musculaires lisses. Dans ces cellules, la stimulation d' $ET_A R$ par ET-1 entraîne une augmentation du tonus vasculaire par une voie dépendante du calcium (Ca^{2+}), via $G_{q/11}$ et l'activation de la MLCK, et par une voie indépendante de Ca^{2+} , via $G_{12/13}$ et la voie ROCK. AC : adénylyl cyclase ; CaM : calmoduline ; COX-2, cyclooxygenase-2 ; DAG : diacylglycéról ; eNOS : NO synthase endothéliale ; GC : guanylyl cyclase ; IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate ; NO : monoxyde d'azote ; PGI_2 : prostaglandine I₂ ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKC : protéine kinase C ; PLC β : phospholipase C β ; MLCK : myosin light chain kinase ; Rho-GEF : Rho-guanine nucleotide exchange factor ; Rho-GTP : GTP bound Rho.

4. 2. Rôle de l'axe endothéline dans le muscle cardiaque

Les récepteurs des ET sont exprimés de manière hétérogène dans le cœur humain, $ET_A R$ étant plus fortement exprimés dans les cardiomyocytes¹⁹¹. Il a été décrit que les ET induisaient un effet inotrope positif directe sur le cœur. Ces effets impliquent l'activation de la PKC et de l'échangeur Na^+/H^+ , ce qui aboutit à la

sensibilisation des myofilaments au calcium. Bien que les effets des ET sur la fonction du muscle cardiaque humain soient mal définis, il semblerait qu'ET_AR intervienne dans la contractilité du ventricule gauche. De plus, il a été montré qu'ET-1 augmentait *in vitro* la synthèse de l'ARNm et la sécrétion de l'ANP à partir de cardiomyocytes atriaux de rat, et ce, via un stimulus physique induit par l'activation d'ET_AR^{192, 193}. De même que dans les cellules de muscles lisses, l'ET est responsable de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Cet effet dû à l'activation d'ET_AR serait imputable aux MAPK et aux espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS)¹⁹⁴.

On estime que 3% de la population adulte développera une insuffisance cardiaque, soit plus de 100 millions de personnes dans le monde, de façon hétérogène selon les régions. Une fois l'insuffisance cardiaque développée, la mortalité annuelle, plus forte pour les personnes récemment diagnostiquées, varie de 5 à 30% en fonction de la sévérité des symptômes. Il a été noté qu'en compensation de la diminution de la fonction cardiaque, en cas d'insuffisance cardiaque congestive, il y aurait une régulation positive du système endothéline. Cependant, cette activation soutenue du système endothéline, au lieu de pallier le dysfonctionnement, aggraverait la détérioration du muscle cardiaque, causant entre autres une arythmie et une hypertrophie¹⁹⁵. En effet, ET-1 semble exercer des effets différents sur un myocarde sain et un myocarde malade : dans le premier cas ET-1 exercerait un effet inotrope positif alors que dans le second il serait négatif. Par ailleurs, l'expression d'ET_BR serait diminuée dans cette pathologie¹⁹⁶. Au contraire, la concentration en ET-1 circulante est généralement augmentée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et certaines études suggèrent que cette augmentation est en partie due à l'angiotensine II, ce qui justifierait l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin converting enzyme*, ACE) pour diminuer la libération d'ET¹⁹⁷. La concentration plasmatique d'ET-1 deux à trois fois plus élevée chez les sujets atteints d'insuffisance cardiaque serait consécutive à une augmentation de sa synthèse et à sa libération par les poumons et les cardiomyocytes, et non à un défaut de clairance^{198, 199}. Par ailleurs, le niveau d'ET-1 circulante est non seulement corrélé avec la sévérité des symptômes, mais est aussi un indicateur de survie^{200, 201}.

4. 3. Rôle de l'axe endothéline dans les voies respiratoires

Les ET_AR sont exprimés dans la media des artères pulmonaires. Les ET_BR sont quant à eux présents dans les cellules endothéliales, la media et l'intima des artères pulmonaires. Chez l'homme, l'expression d'ET_BR est plus importante en distal qu'en proximal dans l'intima et inversement dans la media. En revanche, l'expression d'ET_AR dans la media suit un gradient inverse à celui d'ET_BR puisqu'elle est plus importante en proximal qu'en distal^{202, 203}. Les deux récepteurs des ET induisent la prolifération des cellules des muscles lisses en réponse à l'ET-1.

Il a été observé qu'en cas d'hypertension pulmonaire les expressions d'ET-1 et d'ET_AR étaient augmentées dans les poumons²⁰⁴.

Des arguments forts ont mis en évidence la relation entre le dysfonctionnement de l'axe endothéline et l'hypertension artérielle pulmonaire (*pulmonary arterial hypertension*, PAH). Premièrement, dans les cas de PAH idiopathique (IPAH) les patients présentent des concentrations plasmatiques élevées en ET-1²⁰⁴. De plus, il a été montré que la PAH était associée à l'augmentation de l'expression d'ET-1 dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires, ce qui laisse penser que cette production locale contribuerait aux anomalies vasculaires observées dans cette pathologie²⁰⁵. Ces résultats ont encouragé une approche thérapeutique fructueuse en antagonisant l'axe endothéline²⁰⁶.

4. 4. Rôle de l'axe endothéline dans l'homéostasie rénale

Le système endothéline joue un rôle crucial dans la régulation de la fonction rénale, contrôlant la pression sanguine en agissant sur la concentration en Na⁺, et plus largement sur la balance en électrolytes et sur l'excrétion en eau²⁰⁷. De plus, le système endothéline intervient dans la régulation de la croissance et de la prolifération des cellules rénales.

Si l'ensemble des segments du néphron est capable de produire et de lier les ET, cette liaison est plus importante au niveau de la medulla que dans le cortex rénal^{208, 209}. Chez l'homme, comme chez de nombreux mammifères, le ratio ET_AR:ET_BR est équivalent dans le cortex et dans la medulla^{210, 211}. Dans des conditions non pathologiques, les actions diurétiques et natriurétiques des ET sont essentiellement dues à la signalisation d'ET_BR : les ET inhibent le transport de Na⁺ et Cl⁻ dans différents segments du tubule rénal²⁰⁸ ; dans le tubule proximal l'absorption de fluide

et de bicarbonate est inhibée par les ET du fait de la réduction de l'activité Na⁺/K⁺ ATPase²¹².

Différentes données expérimentales ont suggéré l'implication d'ET-1 dans l'insuffisance rénale chronique (IRC)²¹³. De plus, il a été mis en évidence que la production d'ET-1 se trouvait augmentée dans les pathologies rénales²¹⁴. Chez l'homme, il a été observé qu'une perfusion d'ET-1 induisait des effets biologiques importants, via l'activation d'ET_AR, comme la diminution du débit sanguin rénal, du débit de filtration glomérulaire (DFG), du volume urinaire et de la natriurèse. En effet, l'utilisation d'antagonistes d'ET_AR améliore sensiblement tous ces paramètres dans des modèles expérimentaux²¹⁵.

4. 5. Rôle de l'axe endothéline dans l'embryogénèse

L'implication du système endothéline dans le développement a été principalement mise en évidence par des expériences d'inactivation de gènes chez la souris.

Il a été montré qu'ET-1, ET_AR et ECE-1 interviennent dans la mise en place des structures cranofaciales et cardiaques dérivées des crêtes neurales²¹⁶⁻²¹⁸. Par ailleurs l'ET-3, ET_BR et l'ECE-1 sont nécessaires au développement correct des mélanocytes dérivés de la crête neurale et des neurones entériques^{217, 219, 220}.

Les souris « *knockout* » (KO) pour ET-1 et ET_AR meurent à la naissance d'une asphyxie mécanique due à des malformations sévères des structures faciales et de la gorge. Les souris KO pour ECE-1 meurent quant à elles *in utero*. De façon plus générale, les souris déficientes en ET-1, ET_AR et ECE-1 présentent des malformations cranofaciales extrêmement sévères telles qu'un palais fendu et une hypoplasie de la langue, mais ont également une atteinte des structures de l'oreille moyenne. De plus, ces souris sont victimes d'atteintes artérielles graves comme une interruption de l'aorte. Les souris KO pour ECE-1 et ECE-2 sont encore plus sévèrement lésées d'un point de vue cardiaque.

Les souris invalidées pour les gènes ET-3 ou ET_BR, bien que viables à la naissance, présentent des atteintes tout aussi importantes puisqu'elles meurent à 3-6 semaines. Les souris KO pour ET-3, ET_BR ou ECE-1 sont dépourvues d'une part de mélanocytes et d'autre part de système nerveux entérique, ce qui conduit à une dilatation du côlon proximal et un dysfonctionnement intestinal qui entraîne la mort. Chez l'homme, la maladie de Hirschsprung, se traduisant par un fonctionnement

anormal du côlon, est causée par une mutation dans les gènes *EDNRB* et *edn-3*. Les souris KO pour ECE-1 cumulent donc les phénotypes des souris invalidées pour la voie ET-1/ET_AR et de celles invalidées pour la voie ET-3/ET_BR.

Tous ces modèles de souris KO ont permis de mettre en évidence le rôle critique du système endothéline dans le développement.

4. 6. Rôle de l'axe endothéline dans d'autres organes

Dans les paragraphes précédents ont été passés en revue certains rôles physiologiques et physiopathologiques du système endothéline. Cette liste est loin d'être exhaustive. En effet, la biodistribution des ET et de leurs récepteurs étant particulièrement large, les organes et pathologies dans lesquels intervient l'axe endothéline sont nombreux.

Il a par exemple été observé que les concentrations plasmatiques en ET-1 et big ET-1 étaient augmentées dans des cas de grave septicémie, et ce de façon corrélée avec la sévérité de la maladie²²¹⁻²²³. De plus, certaines complications de la maladie seraient imputables aux ET. Par ailleurs, chez les patients ayant fait un accident vasculaire cérébral ischémique, comme dans les modèles animaux, le niveau en ET-1 est également augmenté²²⁴. De façon plus générale, ET-1 augmenterait la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et induirait des dommages neuronaux²²⁵. Les effets de l'axe endothéline sont encore plus étendus dans le cerveau puisqu'il semblerait qu'il soit impliqué dans la maladie d'Alzheimer²²⁶. La maladie est due à l'accumulation de peptide amyloïde β (A β) qui peut être clivé par les ECE. Les patients atteints d'Alzheimer présentent un flux sanguin réduit dans le cerveau et des concentrations élevées d'ECE-2 et d'ET-1 au niveau du cortex temporal. Les symptômes de la maladie ne sont pas liés à une perte d'activité d'ECE-2 ; *in vitro*, le peptide A β induit une augmentation de l'expression du gène codant ECE-2, ce qui pourrait être un mécanisme mis en place pour éviter l'accumulation délétère. Des études récentes indiquent aussi la régulation positive d'*edn-1* par le peptide A β et la contribution d'ECE-1 à la vasoconstriction cérébrale^{227, 228}. Ainsi, l'axe endothéline serait-il une cible possible pour traiter les malades d'Alzheimer. Enfin, on peut citer comme dernier exemple celui de la prééclampsie dans laquelle il est de plus en plus admis qu'ET-1 joue un rôle essentiel. Des études récentes menées sur différents modèles animaux ont montré que l'utilisation d'un antagoniste d'ET_AR permettait de lutter contre l'hypertension gestationnelle^{229, 230}. La maladie de Crohn,

le glaucome, l'asthme, l'obésité et le diabète de type 2^{231, 232} sont autant de pathologies dans lesquelles le système endothéline pourrait intervenir, mais que nous ne traiterons pas ici.

5. Les récepteurs aux endothélines, cibles pharmacologiques

Parce que dans de nombreuses maladies les concentrations en ET-1 circulante sont plus fortes que dans les conditions physiologiques (l'insuffisance cardiaque chronique, les cardiopathies ischémiques, l'hypertension, l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire et l'insuffisance rénale chronique, pour ne citer qu'elles), très rapidement les inhibiteurs des ET ont été imaginés. Ainsi, depuis plus de vingt ans, de nombreux antagonistes des récepteurs des ET ont été développés et beaucoup d'entre eux ont été testés en essais cliniques. Pourtant aujourd'hui, malgré le nombre impressionnant de pathologies dans lesquelles l'axe endothéline est impliqué et les efforts déployés autour de la mise au point d'antagonistes, très peu des études menées ont abouti à l'autorisation de l'utilisation de ces antagonistes.

En effet, peu de temps après le clonage d'ET_AR et d'ET_BR, des antagonistes oraux des récepteurs furent découverts par différents groupes^{65, 66, 233-239}, offrant de nouvelles opportunités thérapeutiques pour toutes les maladies impliquant le système endothéline. Ces antagonistes, non-sélectifs ou spécifiques d'ET_AR, au vu des résultats précliniques extrêmement encourageants, furent rapidement testés en étude clinique dans le cadre de nombreuses maladies : insuffisance cardiaque congestive, hypertension artérielle pulmonaire, protéinurie, hypertension artérielle, maladies autoimmunes ou encore cancer²⁴⁰. C'est ainsi qu'en 1995, seulement cinq ans après le clonage des récepteurs des ET, fut publiée la première étude clinique chez des patients atteints de sévères insuffisances cardiaques²⁴¹. Tandis que l'étude fondamentale de l'axe endothéline se poursuivait, des effets secondaires sévères furent notés dans les essais cliniques, comme une toxicité hépatique, fréquente dans le cas des sulfonamides et dérivés²⁴², une hypervolémie, observée pour tous les antagonistes²⁴⁰ et qui a par exemple valu l'arrêt des essais cliniques sur l'avosentan²⁴³. Furent relevées également une toxicité testiculaire, encore peu étudiée, et une tératogénicité.

Le manque de recul concernant la biologie du système endothéline et les antagonistes utilisés sont sans aucun doute les principales raisons pour lesquelles

malgré tous les efforts investis autour de ces antagonistes, uniquement deux d'entre eux ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA). Il s'agit du bosentan (dérivé de sulfonamide, non-sélectif ET_AR/ET_BR) et de l'ambrisentan (dérivé carboxylique, spécifique d'ET_AR), les deux étant indiqués dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire²⁴⁴⁻²⁴⁶ et le bosentan étant également prescrit pour les ulcères digitaux de la sclérodermie systémique²⁴⁷. En revanche, aucune des études réalisées chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque congestive ou de cancer n'ont permis la mise sur le marché d'antagonistes prescrits dans le cadre de ces pathologies.

La classe des « -sentan » a ainsi raté son entrée dans le monde du médicaments, l'exemple le plus criant étant celui du sitaxsentan (dérivé de sulfonamide) qui, malgré sa meilleure sélectivité pour ET_AR que l'ambrisentan et des résultats cliniques préliminaires encourageants en tant que médicament anti-protéinurique, a été abandonné après la mort de 4 patients pour cause d'insuffisance hépatique²⁴⁸. On peut également citer le bosentan qui semblait avoir des effets positifs sur l'insuffisance cardiaque²⁴⁹, mais qui malheureusement induit une augmentation de l'ET circulante et une rétention d'eau conséquente.

Ces échecs sont d'autant plus décevants que le ciblage de l'axe endothéline est prometteur dans bon nombre de pathologies. En effet, il a été montré que les antagonistes des récepteurs des ET, en particulier ceux dirigés contre ET_AR, exerçaient un effet protecteur sur le rein²⁰⁷ : des essais cliniques de phase II ou III réalisés avec des antagonistes variés (atrasentan, avosentan, darusentan, sitaxsentan) ont montré une réduction de la protéinurie chez des patients atteints de maladie rénale chronique²⁵⁰. Ces inhibiteurs réduisent également la pression artérielle dans les cas d'hypertension artérielle essentielle et de maladie rénale chronique^{213, 251}.

B. L'axe endothéline dans la carcinogénèse

1. Expression de l'axe endothéline dans les cancers

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'importance de l'axe endothéline à la fois dans le développement et la progression tumorale. D'une part, la production d'ET, majoritairement ET-1, a pu être identifiée dans de nombreuses

tumeurs ; d'autre part, une dérégulation de l'expression des récepteurs des ET, souvent une surexpression d'ET_AR et dans certains types de cancers une surexpression d'ET_BR, a également été mise en évidence (**Figure 14**). En plus de leur présence à la membrane des cellules cancéreuses, les récepteurs des ET se retrouvent également à la surface des cellules stromales qui constituent le microenvironnement tumoral et contribuent à la progression de la maladie, comme les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, les fibroblastes et les cellules inflammatoires.

Dans les cellules cancéreuses, les récepteurs des ET peuvent être activés soit de façon autocrine, par le ligand produit par les cellules elles-mêmes, soit par le ligand produit par les cellules du stroma de façon physiologique ou en réponse aux cellules cancéreuses, auquel cas il s'agit d'une boucle paracrine. En réponse à leur activation, les récepteurs des ET activent des cascades de signalisation diverses aboutissant à une gamme variée d'effets cellulaires qui favorisent le développement du cancer. Pour autant, la progression tumorale n'est pas seulement due à une signalisation « linéaire » de l'axe endothéline, mais au contraire à un réseau complexe de voies de signalisation croisées impliquant d'autres facteurs de croissance comme l'EGF et le VEGF (pour *vascular endothelial growth factor*), qui participent à la stimulation de la migration, de l'invasion, de la néovascularisation, de la prolifération et de la survie.

En 1990 M. Kusuvara et ses collègues ont pour la première fois mis en évidence la production d'ET-1 par différentes lignées cancéreuses notamment issues de cancers mammaire, pancréatique et de carcinome du côlon²⁵², les concentrations en ET-1 circulantes relevées ayant été estimées suffisantes pour stimuler la croissance cellulaire. Cependant, à l'époque les auteurs n'étaient pas parvenus à détecter les récepteurs des ET à la surface des lignées cancéreuses mais uniquement sur des lignées fibroblastiques, les laissant de ce fait imaginer un effet de l'ET-1 uniquement sur le stroma. Il a finalement été clairement établi que l'ET-1 était produite par un grand nombre de cancers et qu'elle intervenait à différents stades de développement de la maladie. ET-1 est à l'heure actuelle le ligand des récepteurs des ET le plus étudié dans le cancer. Il a été identifié dans les cancers de l'ovaire, de la prostate, du sein, du col de l'utérus, de l'endomètre, de la vessie, du rein, du poumon, du colon, du pancréas, du sarcome de Kaposi, de tumeurs du cerveau, du mélanome et de métastase osseuse²⁵³, cette liste n'étant pas exhaustive.

Si la surexpression d'ET-1 a été étudiée dans de nombreux cancers, à ce jour, moins d'informations sont disponibles concernant ET-2 et ET-3. Pourtant,

concomitamment à la découverte de la production d'ET-1 par certaines cellules cancéreuses, ET-2 a été isolé de lignées d'adénocarcinome rénal²⁵⁴. Alors qu'il était admis qu'ET-2 mimait les actions du ligand plus abondant ET-1, ce n'est que plus récemment qu'il y eut un regain d'intérêt pour le ligand, après la mise en évidence de sa surexpression dans le cancer du sein^{255, 256}. En effet, l'expression d'ET-2 est augmentée *in vivo* dans la zone hypoxique de la tumeur du sein chez la souris, résultats corrélés aux conditions hypoxiques *in vitro*, où une augmentation de l'expression d'ET-2, ET_AR et ET_BR a été observée. Des niveaux élevés d'ET-2 ont également été détectés dans des carcinomes basocellulaires, s'accompagnant d'une activation anormale de la voie *Hedgehog* (HH), dont ET-2 pourrait être une cible directe²⁵⁷. Enfin, l'expression de l'axe ET-3/ET_BR est fortement impliquée dans la progression tumorale du mélanome^{258, 259}.

De façon intéressante, des résultats récents suggèrent qu'au sein d'une même tumeur il peut exister une expression différentielle des isoformes par des populations cellulaires distinctes. Cette observation a notamment été faite dans le cas du glioblastome : alors qu'une population de cellules cancéreuses exprime ET-3, les cellules les plus différenciées expriment ET-1²⁶⁰.

Le premier niveau de régulation de l'activité des ET se situe à un niveau épigénétique⁴⁶. C'est en effet l'expression aberrante du ligand et la surexpression de ses récepteurs et/ou la suractivation des voies de signalisation associées qui contribuent à l'initiation et la progression tumorale. Des études ont permis de mettre en évidence une hyperméthylation associée à une diminution de l'expression d'*EDN2* et *EDN3* dans les tumeurs de patients atteints de cancer du colon ainsi que dans diverses lignées cellulaires²⁶¹. Cette régulation épigénétique de l'axe endothéline concerne également les récepteurs. Alors que ET_BR est prédominant dans l'épithélium sain de prostate, son niveau d'expression est réduit dans les lignées établies à partir de cellules cancéreuses ; dans ces lignées les effets d'ET-1 sont alors relayés par ET_AR, tandis qu'on observe une méthylation des ilots CpG d'*EDNRB*. Chez les patients, cette méthylation, associée au silencing du gène, concerne 70% des tumeurs primaires et métastatiques et est inexistante dans les tissus normaux²⁶². L'hyperméthylation du promoteur d'*EDNRB* est un phénomène également observé dans le carcinome nasopharyngé, le cancer de la vessie et du côlon²⁶³. L'ensemble de ces inactivations épigénétiques pourraient être des étapes essentielles à l'apparition du cancer.

Bien souvent, l'activation de l'axe endothéline est corrélée de façon négative à la santé du patient. La big ET-1 et ET_AR sont d'ailleurs perçus comme des marqueurs de progression tumorale et des indicateurs de survie à long terme²⁶⁴⁻²⁶⁶. L'augmentation de la concentration en ET-1 dans l'éjacula humain est par exemple associée à la progression du cancer de la prostate²⁶⁷.

Tumeur	ET _A R	ET _B R	Phénotype associé à l'expression du récepteur
Col de l'utérus	+		
Colon	+		Augmentation du grade de la tumeur et diminution de la survie
Estomac	+	-	
Foie		-	
Glioblastome	+	+	
Mélanome		+	Agressivité du cancer, augmente avec le grade de la tumeur et métastase aux ganglions lymphatiques
Ovaire	+		Augmentation du grade de la tumeur, chimiorésistance, angiogenèse et métastase
Os	+		
Pancréas	+		
Poumon	+ (NSCLC)	+ (SCLC)	Diminution de la survie (NSCLC)
Prostate	+	-	Augmentation du grade de la tumeur et métastase osseuse
Rein	+	+	Associé au grade de la tumeur (ET _A R) et à la survie (ET _B R)
Sein	+	+	Diminution de la survie, angiogenèse et augmentation de la métastase osseuse
Tête et cou	+		Diminution de la survie
Vessie	+	+	Diminution de la survie
Vulve		+	Diminution de la survie

Figure 14. Expression des récepteurs des ET dans les cancers. Les récepteurs des ET sont surexprimés (+) dans de nombreux cancers. Dans certains cas, au contraire, une perte d'expression (-) du récepteur peut être observée. NSCLC : *non-small-cell lung cancer* ; SCLC : *small-cell lung cancer*.

2. Implication de l'axe endothéline dans la progression tumorale

De nombreuses études, en particulier celles réalisées par l'équipe d'A. Bagnato, ont apportés des arguments solides selon lesquels la signalisation complexe de l'axe endothéline contribue à la progression tumorale. Les effets cellulaires tumorigènes des ET sont de deux types. Ils peuvent concerner les cellules cancéreuses elles-mêmes et sont, dans la grande majorité des cancers, causés par l'activation d'ET_AR ; il s'agit de la prolifération, la survie, la migration, l'invasion et la transition épithélio-

mésenchymateuse (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) (**Figure 8**). Les effets cellulaires des ET peuvent également cibler les cellules du microenvironnement, ou cellules du stroma. Alors qu'ET_BR est mis en jeu lors de la néovascularisation et de la modulation du système immunitaire, c'est ET_AR qui intervient dans le remodelage osseux. Les deux récepteurs se trouvent également impliqués dans les phénomènes de nociception. Ainsi, en plus de son implication dans la tumorigenèse même, l'axe endothéline semble jouer un rôle important sur le microenvironnement dans la progression tumorale.

Si l'implication d'ET-1 dans la progression tumorale a été largement étudiée et décrite, on dispose actuellement de beaucoup moins d'information concernant les contributions d'ET-2 et d'ET-3 au sein de la tumeur. Aussi, les paragraphes qui suivent concernant l'implication de l'axe endothéline dans la progression tumorale sont-ils principalement focalisés sur les effets cellulaires d'ET-1 dans le cancer.

2. 1. Prolifération

Même si la réponse proliférative à l'ET varie énormément d'un type cellulaire cancéreux à l'autre, il est clair que la signalisation de l'axe endothéline joue un rôle crucial dans la croissance tumorale.

Les ET sont capables de stimuler la croissance de diverses lignées cellulaires cancéreuse *in vitro*. Alors qu'*in vitro* ET_AR est responsable de la prolifération de tumeurs épithéliales comme celles de l'ovaire, du col de l'utérus, de la prostate et du colon²⁶⁷⁻²⁷⁰, des études menées sur le mélanome montrent que l'effet prolifératif d'ET-1, tout comme celui d'ET-3, est dans ce cancer relayé par ET_BR, comme dans le cas des gliomes²⁷¹⁻²⁷³. Dans le sarcome de Kaposi il semblerait que les deux récepteurs des ET soient impliqués dans la croissance tumorale²⁷⁴. Si le rôle d'ET-1 comme facteur de croissance autocrine a été démontré sur des lignées de cancers ovarien et colorectal, par l'utilisation d'antagonistes spécifiques d'ET_AR^{270, 275}, le ligand agit également de façon paracrine puisqu'il stimule la croissance des fibroblastes en co-culture, vraisemblablement via les deux récepteurs²⁷⁶.

Sous l'action de la liaison des ET à leurs récepteurs, différentes voies de signalisation agissent de façon synergique et relaient le signal induisant la prolifération cellulaire. L'ET-1 endogène produite par les cellules cancéreuses stimule l'activation de la PLC, de la PKC et la signalisation calcique²⁷⁵, mais aussi l'activation

de protéine tyrosine kinases dont la kinase des adhésions focales (*focal adhesion kinase*, FAK)²⁷⁷.

L'ET peut agir seule, en tant que facteur prolifératif, ou coopérer de façon synergique avec d'autres facteurs de croissance dont l'EGF, le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF), l'insuline, le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), le facteur de croissance des plaquettes sanguines (PDGF), le facteur de croissance transformant (TGF β) et l'interleukine-6 (IL-6)²⁷⁸.

En effet, une voie classique d'amplification du signal prolifératif de l'ET est la transactivation de l'EGFR. Cette transactivation peut être médiée par la libération de précurseurs du ligand via l'action de MMP ou par une phosphorylation directe du RTK par c-Src²⁷⁹. Cette transactivation de l'EGFR par ET-1 est en partie responsable de l'activation de la voie Ras/MAPK et d'AKT^{138, 280}. En aval, l'induction des protooncogènes *c-fos*, *c-jun* et *c-myc* induit une réponse mitogénique^{277, 281}. Dans les cellules de cancer ovarien, comme dans d'autres cancers, l'ET-1 stimule la synthèse d'ADN de façon aussi efficace que l'EGF. De plus les actions de l'ET-1 et de l'EGF sont additives. Le fait que la transactivation de l'EGFR soit en partie responsable de l'effet mitogénique de l'axe ET-1/ET_AR et que l'ET-1 exerce des effets prolifératifs additifs en présence d'EGF suggère la coexistence de circuits autocrines de l'ET-1 et de l'EGF dans les cellules tumorales, ce qui leur conférerait un état prolifératif maximal^{138, 277}.

2. 2. Survie

L'inhibition de l'apoptose conduit à de nombreux troubles cliniques dont la formation de tumeurs. Aussi cette étape est-elle essentielle à la tumorigenèse. Il a en effet été montré qu'ET-1 était non seulement capable de promouvoir la prolifération cellulaire, mais qu'elle était également un facteur anti-apoptotique dans différents types de cellules cancéreuses²⁸². Dans ces cellules, ET-1 est un modulateur des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, parmi lesquelles la voie Akt dépendante de PI3K ou la signalisation de NF- κ B^{283, 284}.

Différentes études ont mis en évidence que l'ET-1 est capable d'inhiber de façon importante l'apoptose induite par le paclitaxel dans les cellules tumorales. L'effet de cette drogue, couramment utilisée en chimiothérapie, notamment dans le cas du cancer de l'ovaire, qui induit la phosphorylation inactivatrice de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, se trouve inhibé par ET-1. La réponse apoptotique du paclitaxel peut être restaurée par l'utilisation d'un antagoniste spécifique d'ET_AR, le BQ-123,

indiquant donc que l'ET-1 contribue à la résistance des cellules tumorales contre cette drogue via ET_AR²⁸³. Ce mécanisme de survie serait notamment dû à l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques telle que la voie Akt²⁸³.

D'autres études, portant par exemple sur le cancer de la prostate ou du colon, ont confirmé cet effet anti-apoptotique de l'axe ET-1/ET_AR. Comme dans le cancer de l'ovaire, dans le cancer de la prostate ET-1 induit la liaison de NF-κB à l'ADN ce qui provoque une augmentation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X et la survivine²⁸⁵, alors que le niveau d'expression des protéines pro-apoptotiques Bad, Bax et Bak est diminué²⁸⁴. Par ailleurs, dans le carcinome du colon ET-1 inhiberait la mort cellulaire induite par l'interaction FAS/FASL²⁸⁶.

ET-2/ET_BR constitue également un axe anti-apoptotique, puisqu'il a été montré qu'ET-2 remplissait un rôle de facteur de survie, rôle annulé par l'antagoniste spécifique d'ET_BR, le BQ788, dans les cellules cancéreuses de tumeur du sein soumises à un environnement hypoxique²⁵⁵. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* chez la souris : un traitement avec le BQ788 provoque la réduction de la tumeur et une augmentation de la zone nécrotique dans celle-ci. Dans les cellules de mélanome, ET-1 et ET-3 induisent la survie via ET_BR^{258, 259}.

L'utilisation d'un antagoniste spécifique d'ET_AR pourrait avoir une activité anti-tumorale médiée par l'inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose. Par ailleurs, une résistance au paclitaxel est observable lors du traitement de divers cancers. Celle-ci est notamment induite par l'axe endothéline. Ainsi, combinée à une chimiothérapie conventionnelle, l'utilisation d'antagonistes spécifiques d'ET_AR ou ciblant les deux types de récepteurs des ET induirait de façon plus efficace l'apoptose^{269, 287, 288}. De façon plus générale, ces études montrent l'importance d'une thérapie anti-cancéreuse alliant différentes stratégies pour cibler la tumeur et, a fortiori, l'enjeu incontournable du développement de nouvelles thérapies moins conventionnelles, comme les biothérapies.

2. 3. Migration et invasion

Pendant la progression tumorale, les cellules cancéreuses libèrent des protéases, perdent leur polarité et leurs jonctions cellulaires ; elles acquièrent ainsi un phénotype mésenchymateux qui leur permet d'envahir la matrice extracellulaire (MEC) et de migrer à distance de la tumeur primaire. Ces changements se caractérisent par le désassemblage des jonctions gap (*gap junction intercellular*

communications, GJIC), serrées et adhérentes, une réorganisation des adhésions au substrat ainsi qu'un remodelage du cytosquelette²⁸⁹.

Le rôle d'ET-1 a été étudié dans le cas du cancer du sein triple négatif (*Triple-negative breast cancer*, TNBC), caractérisé par l'absence d'expression de récepteurs aux oestrogènes (*estrogen receptor- α* , ER- α), à la progestérone (*progesterone receptor*, PR) et au facteur de croissance épidermique humain (*human epidermal growth factor receptor-2*, HER-2), dont le pronostic est particulièrement mauvais²⁹⁰. Dans ce cancer, on observe une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'ET-1 qui induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses via ET_AR.

Les mécanismes par lesquels ET-1 induit la dégradation de la MEC commencent à être élucidés. ET-1 régule à différents niveaux deux familles de protéinases : les métalloprotéases matricielles (MMP) et le système des activateurs du plasminogène de type urokinase. Dans les cellules cancéreuses ET-1 est capable d'activer diverses MMP solubles comme MMP2, MMP9, MMP3, MMP7 et MMP13, mais aussi la MMP membranaire MT1-MMP et au contraire diminue les inhibiteurs de MMP. Ces différents processus conduisent à la dégradation de la MEC¹¹³.

ET-1 contribue également à la mobilité cellulaire et à la désorganisation du réseau de fibres de stress en augmentant l'activation de FAK, de la paxilline et de Rho, dont on sait qu'elles interviennent dans la transduction de signaux invasifs¹¹³. L'augmentation de la mobilité cellulaire dépend aussi de la régulation de l'expression de différentes intégrines puisqu'elles relient la cellule à la MEC sous-jacente. C'est l'*integrine-linked kinase* (ILK) qui connecte les intégrines au cytosquelette d'actine, coordonnant ainsi l'étalement cellulaire et l'organisation du cytosquelette, nécessaires à la mobilité cellulaire²⁹¹. Comme il a été montré dans le cancer de l'ovaire et le mélanome, ET-1 module également l'expression des intégrines^{258, 291}. Dans les cellules de cancer ovarien, l'interaction de l'intégrine β 1 avec le collagène de type I augmente l'activité de l'ILK ; l'ET-1 serait capable d'imiter ce signal et coopérer avec l'intégrine β 1 pour activer l'ILK, induisant la signalisation nécessaire à la mobilité cellulaire et à l'invasion²⁹¹. Dans les cellules de mélanome, la formation de clusters d'intégrine β 1 a été observée au niveau du front de migration de la cellule, ce qui induit une dégradation polarisée de la MEC ainsi qu'une migration et une invasion collective. Dans ces cellules, ET-1 induit l'augmentation de l'expression de l'intégrine β 1, de MT1-MMP et MMP2, induisant l'augmentation de l'adhésion aux molécules de la MEC et augmentant les capacités migratrice et invasive.

La modification des GJIC est également une étape qui permet l'échappement de la cellule tumorale au contrôle du microenvironnement tissulaire, ce qui promeut l'invasion locale et la dissémination métastatique. Alors que l'établissement d'une GJIC requière l'alignement de deux hémi-canneaux hexamériques de connexines, la réduction ou la mauvaise expression des connexines semble être un facteur important de la progression tumorale. Dans le carcinome ovarien et le mélanome, ET-1 agit via ET_AR et ET_BR respectivement, induisant la phosphorylation des connexines via la tyrosine kinase Src, ce qui provoque un défaut de couplage^{258, 292}. La capacité d'ET-1 à perturber les communications intercellulaires ainsi que son action sur l'adhésion à la MEC sont des processus importants de la progression tumorale.

L'ET-1 sécrétée par les cellules cancéreuses est un modulateur paracrine du stroma tumoral. Elle agit sur ses récepteurs exprimés à la surface des fibroblastes constitutifs du tissu normal adjacent de la tumeur²⁹³. Dans le cas du cancer du colon, le traitement *in vitro* par l'ET-1 des fibroblastes adjacents de la tumeur induit leur croissance, migration, contraction et la production de protéines de remodelage de la MEC²⁹³. ET-1 agirait sur les cellules du microenvironnement tumoral, notamment sur les fibroblastes, induisant ainsi la mise en place d'une niche favorable au maintien et à la progression de la tumeur.

Comme il le sera d'avantage détaillé dans la partir B. 2. 7., les macrophages remplissent également un rôle important dans les processus d'invasion tumorale.

2. 4. Transition épithélio-mésenchymateuse et cellules souches tumorales

La transition épithélio-mésenchymateuse (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) peut être initiée par divers signaux extracellulaires. La reprogrammation des cellules épithéliales à un état mésenchymateux implique le contrôle d'un réseau complexe de signalisation et de facteurs de transcription. ET-1 induirait notamment l'EMT via la régulation positive du facteur de transcription mésenchymateux Snail, codé par le gène *SNAIL*²⁹⁴. ET-1 induit la transcription de *SNAIL* et stabilise la protéine Snail. De plus, ET-1 stabilise la β -caténine et induit l'expression de ses gènes cibles, par exemple *EDN1* et *MMP2*¹⁴⁹, qui participent à l'EMT.

L'hypoxie est l'un des facteurs physiologiques qui induit l'EMT grâce à divers mécanismes, dont la régulation positive de la sous unité α du facteur induit par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor 1 α* , HIF1 α)²⁸⁹. La boucle autocrine ET-1

interviendrait donc dans la coopération entre la signalisation intracellulaire et les stimuli extracellulaires dans l'induction de l'EMT²⁵⁹.

Les interactions entre les cellules tumorales et la niche microenvironnementale peuvent non seulement induire l'EMT mais également permettre le maintien de caractéristiques de cellules souches²⁹⁵. En effet, de forts niveaux d'ET-1 ont été relevés dans des populations supposées de cellules souches cancéreuses (CSC) issues des cellules cancéreuses de colon²⁹⁶. En revanche, il semblerait que ce soit la voie ET-3/ET_BR qui soit surexprimée dans les cellules souches de glioblastome²⁶⁰. En effet, dans ces cellules le gène *EDN3* est surexprimé alors que l'expression du gène *EDN1* est diminuée. A l'inverse, dans les cellules glioblastome « classiques » une surexpression d'*EDN1* est observée. Cette observation suggère le rôle d'ET-3 dans le maintien d'une quiescence des cellules, limitant leur potentiel tumorigénique, comme ce serait également le cas pour d'autres cancers. Ainsi, le ciblage de la voie autocrine ET-3/ET_BR impacterait la récurrence tumorale, puisqu'elle servirait de mécanisme de survie et de maintenance d'un pool de cellules souches cancéreuses.

L'acquisition de caractéristiques de cellules souches et l'EMT, qui ont pu être observées dans le cas du cancer de l'ovaire par exemple, est de plus en plus perçue comme une composante cruciale de la chimiorésistance des cellules cancéreuses²⁸⁹. C'est pourquoi le ciblage de cellules cancéreuses affichant de telles propriétés et surexprimant donc l'axe endothéline apparaît pertinent. En effet, dans le cas de cellules de cancer de l'ovaire chimiorésistantes et qui surexpriment ET_AR, le blocage du récepteur entraîne la réversion du phénotype mésenchymateux, l'inhibition du caractère invasif et restaure la sensibilité à la chimiothérapie²⁹⁷. D'autres études supportent également l'idée que l'expression d'ET_AR serait un indicateur de résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, en en faisant une cible préférentielle de thérapie combinée.

2. 5. Métastase

Différents travaux ont permis de mettre en évidence les effets de l'axe endothéline sur la colonisation métastatique. En effet, différentes études *in vitro* et *in vivo*, reposant sur un modèle de métastase de cancer de l'ovaire, ont révélé l'implication d'ET_AR dans l'acquisition d'un phénotype cellulaire métastatique^{297, 298}. Plus précisément, il semblerait que ce soit une voie de signalisation dépendante de la β -caténine, via l'activation d'ET_AR et le recrutement de la β -arrestine, qui soit

impliquée dans le phénomène métastatique¹⁴⁹. Dans le cas du mélanome, c'est la surexpression et l'activation d'ET_BR qui sont associées à une augmentation de l'incidence de la métastase spontanée vers le système nerveux central²⁹⁹. Dans ces différentes études, que la progression métastatique soit associée à une surexpression d'ET_AR ou ET_BR, elle se trouve diminuée par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs des ET. Enfin, il a été montré qu'ET-1 intervenait dans un modèle de métastase pulmonaire de cellules cancéreuse de vessie^{300, 301}. Dans ce modèle, *EDN1* a été identifié comme une cible importante réprimée par le suppresseur de métastase *RHO GDP-dissociation inhibitor 2* (RHO-GDI2). Dans ces cellules cancéreuses de vessie exprimant de faibles niveaux de RHO-GDI2, c'est l'axe ET-1/ET_AR qui est responsable de la métastase. Chez les patients atteints de cancer de la vessie, ET-1 semble être un biomarqueur de métastase pulmonaire associé à une survie réduite.

La contribution du système immunitaire au développement du cancer, et plus particulièrement à la métastase, fera l'objet d'un développement en B. 2. 7., de même que l'implication de l'axe endothéline dans la métastase osseuse qui sera traité en B. 2. 8..

2. 6. Angiogenèse et lymphangiogenèse

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont des processus régulés par des facteurs environnementaux, parmi lesquels l'hypoxie. Un tel phénomène survient généralement au sein de la tumeur lorsque celle-ci atteint une certaine taille.

L'ET, en particulier ET-1, est connue pour être un facteur mitogénique des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, des muscles lisses vasculaires, des fibroblastes et des péricytes. ET_BR, quant à lui, contrôle la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques^{282, 302-304}. Lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules endothéliales libèrent des protéases, comme MMP2, ce qui leur permet de migrer, proliférer et l'envahir le tissu environnant, formant ainsi des capillaires. Bien que le VEGF soit le principal régulateur de la néovascularisation, ET-1, via ET_BR, participe également aux différentes étapes de ce processus et induit un puissant effet additif avec les membres de la famille du VEGF^{302, 303}. Si ET-1 est capable de moduler l'angiogenèse et la lymphangiogenèse indépendamment du VEGF, elle peut aussi le faire par l'induction de ce dernier^{302, 303}. Cette action conjointe des deux axes de signalisation se retrouve dans différents types de tumeurs où l'augmentation de l'expression d'ET-1 et de ses

récepteurs est associée à l'expression de VEGF et de ses récepteurs, VEGFR1 (FLT1) et VEGFR2 (KDR). Ces expressions sont de plus corrélées à la densité des microvaisseaux dans la tumeur, suggérant des rôles complémentaires d'ET-1 et du VEGF pendant la néovascularisation³⁰².

Différentes observations appuient le rôle de l'axe ET-1/ET_BR dans la lymphangiogenèse : les expressions d'ET-1, ET_AR et ET_BR sont corrélées à l'augmentation de la dissémination lymphatique^{305, 306} ; ET_BR est présent dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques humains³⁰³ ; ET-1, via ET_BR, promeut la croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques³⁰³ ; l'expression d'*EDN1* est significativement augmentée dans les cellules endothéliales lymphatiques à fort potentiel métastatique³⁰⁷.

De nombreuses études s'intéressent à l'implication d'ET-1 dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales en réponse à un microenvironnement hypoxique, plus particulièrement à la relation entre ET-1 et HIF1 α , une sous-unité indispensable du facteur de transcription répondant à l'hypoxie. Dans des conditions normoxiques, la protéine PHD (pour *prolyl hydroxylase domain*) catalyse l'hydroxylation de HIF1 α , ce qui induit sa dégradation par le protéasome. Au contraire, en conditions hypoxiques l'absence de cette hydroxylation stabilise HIF1 α , lui permettant de former un facteur de transcription dimérique HIF. Ce facteur se lie sur des sites *hypoxia-response element* (HRE), induisant la transcription de gènes pro-angiogéniques, dont ceux de la famille VEGF. Quelque soient les conditions d'oxygénation des cellules tumorales, le traitement par l'ET-1 réduit la dégradation de HIF α ^{308, 309}. ET-1 stabiliserait HIF1 α en diminuant la quantité de PHD³⁰⁹. Le complexe HIF1 est capable d'induire l'expression de VEGFA et des facteurs lymphangiogéniques spécifiques VEGFC et VEGFD ainsi que l'expression de leurs récepteurs VEGFR3^{259, 303}. ET-1, via la stabilisation de HIF1 α , amplifie ainsi la néovascularisation médiée par VEGF. Ce phénomène est de surcroît entretenu par une boucle autocrine, HIF1 activant la transcription d'*EDN1*. Aussi, ET-1 est contrôlée par le microenvironnement tumoral et le modifie lui-même en retour^{308, 310}.

Dans des conditions hypoxiques, ET-1 augmente l'activité des promoteurs des cyclooxygénases 1 et 2 (COX1, COX2) et la production de prostaglandine E2 (PGE2)^{311, 312}. Plus récemment, des études ont montré que l'IL-6 augmenterait la sécrétion d'ET-1 par les cellules cancéreuses, induisant de ce fait l'angiogenèse³¹³. Il a également été montré que la surexpression du suppresseur de tumeur PTEN (pour *Phosphatase and TENsin homolog*) atténuait le processus angiogénique en inhibant la migration des

cellules endothéliales grâce à la diminution du niveau d'expression de l'ET-1 et d'ET_BR³¹⁴.

Il existe une génération *de novo* de structures ressemblant à des capillaires qui se réalise de façon totalement indépendante des cellules endothéliales et de l'angiogenèse détaillée plus haut. Il s'agit d'un phénomène nommé mimétisme vasculaire, ne mettant en jeu que les cellules tumorales elles-mêmes¹³⁹. Le profil d'expression génique de lignées cellulaires de mélanome a mis en évidence d'une part l'association d'*EDNBR* à un phénotype cancéreux agressif et d'autre part que ce gène intervient dans l'organisation d'un réseau vasculaire mimétique³¹⁵. ET-1, via ET_BR, promeut donc la formation d'un réseau tubulaire de cellules de mélanomes, phénomène impliquant la transactivation de VEGFR-3 par VEGFC et l'activation des voies MAPK et AKT¹³⁹. ET_BR et de VEGFR-3 travaillent ici en synergie et augmentent la plasticité et la mobilité cellulaire, favorisant ainsi le mimétisme vasculaire.

2. 7. Inflammation et système immunitaire

Les tumeurs ont un microenvironnement complexe dans lequel les cellules immunitaires sont très représentées. En effet, les réponses inflammatoires remplissent un rôle important à différents stades de développement du cancer c'est à dire l'initiation, la transformation maligne, l'invasion et la métastase. Les phénomènes inflammatoires interviennent également dans la surveillance immunitaire et la réponse de la tumeur à la thérapie. Aussi, les cellules immunitaires capables d'infiltrer les tumeurs, comme les *Tumor-Associated Macrophages* (TAM) et les *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) occupent-elles une place importante dans le cancer. Or, il a été montré que l'axe endothéline était capable de moduler le trafic, la différenciation et l'activation des cellules immunitaires infiltrant la tumeur (**Figure 15**).

Si dans un premier temps on a pensé que les cellules immunitaires étaient impliquées dans des processus anti-tumoraux, des preuves cliniques et expérimentales ont permis de mettre en évidence que dans la majorité des cas les TAM, bien au contraire, augmentaient la progression tumorale en promouvant l'invasion cellulaire, la migration, en intervenant dans l'angiogenèse et en supprimant la réponse anti-tumorale³¹⁶ (**Figure 15**).

Les ET jouent un rôle dans le recrutement des macrophages activés au sein de la tumeur. En effet, l'ET induit un chimiotactisme des macrophages, qui serait relayé par

ET_AR et ET_BR. M.J. Grimshaw et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence que la réponse chimiotactique des macrophages pour l'ET-2, médiée par ET_BR dans ce modèle d'étude, est aussi forte que celle obtenue avec la chimiokine inflammatoire CCL2³¹⁷. Dans les macrophages, la liaison d'ET-1 à ses récepteurs active les voies de signalisation NFκB et AP-1 et la production en aval d'IL-6, de CCL2 (pour *chemokine (C-C motif) ligand 2*), de VEGF, d'EGF, de TGFβ (pour *transforming growth factor*, facteur de croissance transformant), de MMP, de COX2 et également de l'ET. Ceci provoque la stimulation de l'invasion des cellules cancéreuses et la colonisation de sites métastatiques préférentiels³¹⁸. L'ET-2 est également décrite comme augmentant l'activation des macrophages³¹⁷. Par ailleurs, alors que les macrophages sont capables de produire de l'ET, cela ne semble pas être le cas des neutrophiles et des lymphocytes³¹⁰.

Différents modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'étudier les effets de l'axe endothéline sur les TAM et la progression tumorale. Dans le cancer de la vessie l'ET-1 agit sur ET_AR, augmentant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses et des macrophages et induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de protéases. Celles-ci participent à la rupture de l'intégrité vasculaire, permettant ainsi la dissémination des cellules cancéreuses jusqu'aux poumons. Un antagoniste d'ET_AR, le zibotentan, permet, lorsqu'il est administré avant l'inoculation des cellules cancéreuses chez la souris, de freiner le développement des métastases pulmonaires. De façon intéressante, ce traitement diminue le nombre de TAM, suggérant que l'axe ET-1/ET_AR est à l'origine de l'infiltration des macrophages et de la production de cytokines au niveau du site préférentiel de métastase, avant le développement de celle-ci³⁰¹. L'expression de l'axe ET1/ET_AR dans la tumeur est donc, dans ce modèle, nécessaire à la colonisation métastatique. Une autre étude récente, menée par C.C. Chen et ses collaborateurs a visé à élucider la contribution des macrophages à l'interaction entre des cellules cancéreuses de sein et des cellules endothéliales *in vitro*. Ils ont mis en évidence la production par les macrophages de l'interleukine 8 (IL-8) et du *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) qui stimulent la production d'ET-1 et ET-2 et de leurs récepteurs dans les cellules cancéreuses et endothéliales. La production plus massive d'ET-1 par les cellules endothéliales favoriserait le chimiotactisme des cellules tumorales vers les cellules endothéliales. Les macrophages stimuleraient également l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales, via les intégrines, et la migration transendothéliale par le biais de l'axe endothéline³¹⁹. Les macrophages participent donc activement à la métastase puisqu'ils interviennent

dans l'intravasation. De plus, ils aideraient à l'implantation des cellules métastatiques après extravasation (**Figure 15**).

Enfin, le rôle d'ET-2 a notamment été étudié dans le cancer du sein : les zones hypoxiques de la tumeur qui expriment ET-2 sont capables d'attirer et d'activer les macrophages. En présence des macrophages activés, les cellules cancéreuses de sein migrent alors vers ET-1 et ET-2, mais pas vers ET-3, envahissant ainsi le tissu environnant³²⁰.

Le rôle d'ET_BR dans l'infiltration tumorale lymphocytaire a plus particulièrement été étudié dans le cas du cancer de l'ovaire. Dans ce cancer, il a été montré que l'activation d'ET_BR inhibe l'infiltration tumorale par les lymphocytes T (L_T), ce qui est accompagné d'une diminution de la survie chez les patientes. En effet, la surexpression d'ET_BR est associée à la perte de TIL. Par le biais de l'activation d'ET_BR, ET-1 inhibe l'adhésion des L_T à l'endothélium, en réprimant l'expression de l'*endothelial intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1)³²¹. On comprend ici la pertinence d'utiliser des antagonistes d'ET_BR y compris pour les cancers surexprimant ET_AR puisqu'ils augmenteraient l'infiltration des L_T dans les tumeurs.

Ainsi, en favorisant l'inflammation, d'une part, et en inhibant l'infiltration et l'activation de cellules effectrices susceptibles de cibler la tumeur, d'autre part, l'axe endothéline contribue largement à l'agressivité et à la progression tumorale.

2. 8. Ostéogenèse

Certaines tumeurs solides dans lesquelles l'axe endothéline est dérégulé métastasent à l'os, causant ainsi une réponse ostéoblastique. Cette métastase osseuse, comme la tumeur primaire, est en partie imputable à l'axe endothéline. En effet, différentes études ont montré que l'axe endothéline était impliqué dans la réponse ostéoblastique mise en place. Plus précisément l'ET-1 intervient dans le contrôle de la balance production/dégradation de la matrice osseuse, stimulant d'une part la mitogenèse des ostéoblastes, et réduisant d'autre part la mobilité des ostéoclastes et la résorption osseuse dont ils sont à l'origine.

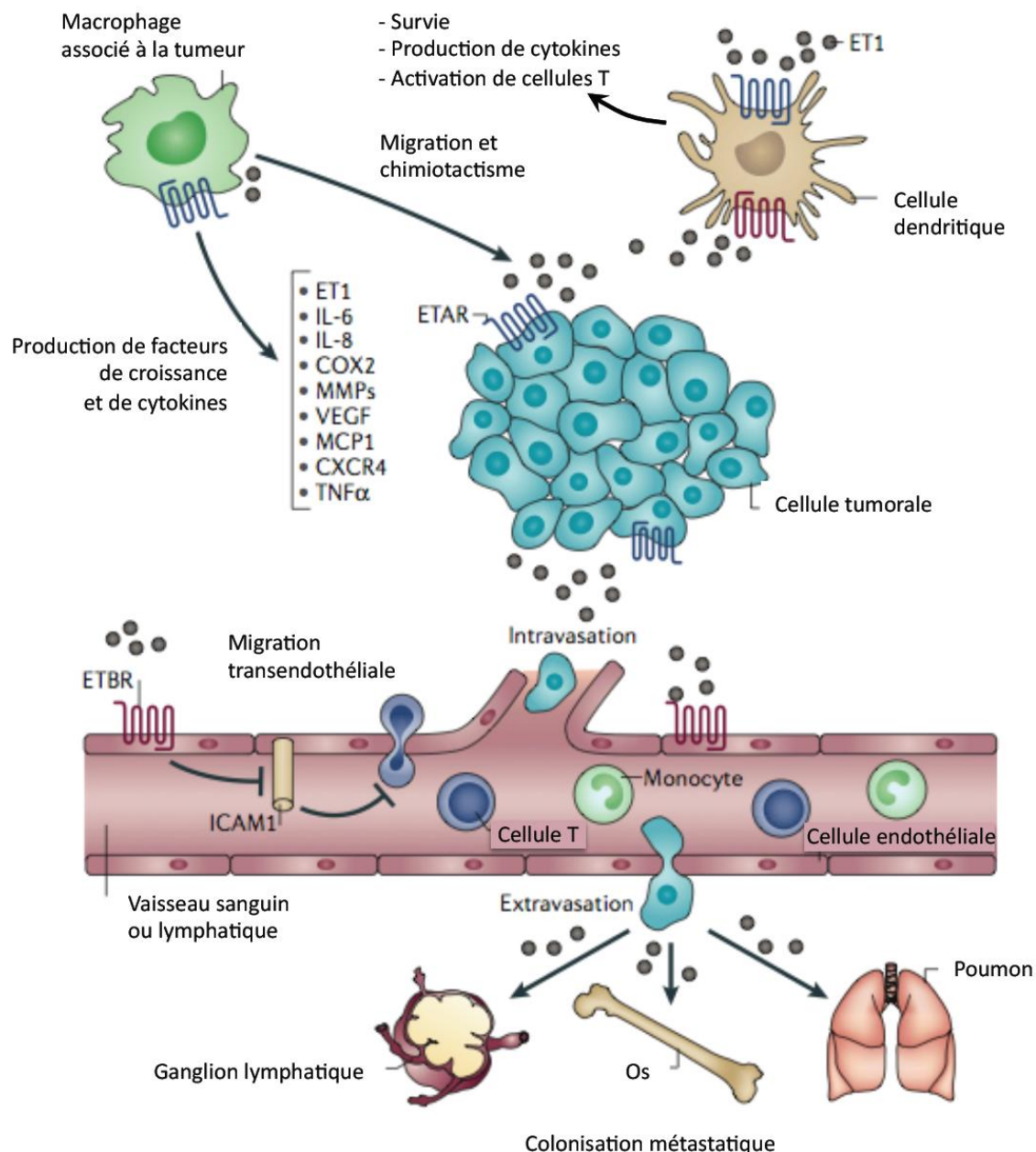


Figure 15. Rôle de l'axe endothéline dans l'immunomodulation du cancer. L'axe endothéline influence le microenvironnement immunitaire tumoral. Au niveau des cellules dendritiques, la liaison d'ET-1 à ses récepteurs entraîne la survie, la production de cytokines et l'activation des cellules T. Dans les macrophages associés à la tumeur, ET-1 induit la transcription de facteurs pro-inflammatoires et la production de cytokines, nécessaires à leur infiltration. De plus, la sécrétion de cytokines inflammatoires par ces macrophages intervient dans les processus d'intravasation, d'extravasation et de colonisation métastatique. En réponse aux chimiokines, les cellules cancéreuses migrent à travers un gradient jusqu'à un site secondaire de colonisation. ET-1 est également à l'origine de l'augmentation de la libération de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), crucial à l'extravasation et à l'angiogenèse. Via ET_BR présent à la surface des cellules endothéliales, ET-1 contrôle également la migration transendothéliale et la localisation tumorale des cellules T, en supprimant l'expression de l'*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) à la surface des cellules endothéliales. COX2 : cyclooxygénase 2 ; CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4 ; IL : interleukine ; MCP1 : monocyte chemotactic protein 1 ; MMP : matrix metalloproteinases ; TNF α : tumour necrosis factor α . Proposé par Rosano et al., 2013¹¹³.

J.B. Nelson et ses collègues³²² ont, les premiers, émis l'hypothèse qu'il existait une association entre l'ET-1 et la métastase osseuse chez les patients à un stade avancé du cancer de la prostate. C'est en effet chez les patients atteints de cancers de la prostate et du sein que la métastase osseuse est plus particulièrement étudiée, puisqu'ils sont davantage sujets à ce type de complication. J.J. Yin et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré que les lignées cellulaires de cancers humains du sein et de la prostate sont capables de former des lésions ostéoblastiques qui produisent de l'ET-1⁶⁹.

Dans des modèles expérimentaux animaux, la prolifération des ostéoblastes et la métastase osseuse sont inhibées par l'utilisation d'antagonistes spécifiques d'ET_{AR}, suggérant que ce récepteur est une cible pertinente dans le traitement des tumeurs présentant un tropisme métastatique pour l'os³²³. En effet, les ostéoblastes, qui présentent une densité élevée d'ET_{AR} (bien qu'ils expriment aussi ET_{BR}), répondent à l'ET-1 par l'induction de leur prolifération et la formation d'os^{322, 324}. Il s'agit ici d'une boucle paracrine relayée par ET_{AR} puisque du milieu conditionné de tumeur, tout comme l'ET-1 exogène, stimule la prolifération des ostéoblastes et la formation de matrice osseuse dans des cultures de calottes crâniennes de souris³²³. De plus, le ligand inhibe la mobilité des ostéoclastes, potentialise l'effet pro-ostéogénique d'autres facteurs de croissance et induit la métastase osseuse *in vivo*^{69, 322}.

2. 9. Douleur

Les causes de douleur chez les patients atteints de cancers sont diverses : invasion des tissus mous par la tumeur, compression ou infiltration des nerfs et vaisseaux sanguins, pour ne citer qu'elles. Les douleurs osseuses sont cependant les symptômes les plus fréquents associés aux cancers³²⁵.

On estime qu'environ 70% des malades souffrant de carcinomes du sein ou de la prostate à des stades avancés présentent des complications squelettiques, autrement dit des séquelles osseuses dues aux métastases³²⁶ et que plus de 90% de ces malades mourront avec ce type de métastases. La douleur cancéreuse chronique liée aux métastases osseuses est bien évidemment associée à une mauvaise qualité de vie des patients puisqu'elle est aujourd'hui difficilement contrôlable durant toute la survie des malades³²⁷. La compréhension des mécanismes qui lui sont associés représente donc un enjeu majeur dans l'avancée des soins palliatifs. Différentes causes de cette

douleur sont invoquées. Elle serait d'une part liée à l'ostéolyse de la matrice osseuse par les ostéoclastes, mais également aux cellules tumorales elles-mêmes, aux lésions nerveuses causées par la tumeur, à la production par le stroma du facteur de croissance du tissu nerveux (*nerve growth factor*, NGF), mais aussi à la stimulation des récepteurs vanilloïdes (*vanilloid receptors*, VR) et d'ET_AR.

Le rôle d'ET-1 comme médiateur de la douleur de certains cancers métastatiques a pour la première fois été évoqué par G. Davar et son équipe qui ont mis en évidence une production importante du peptide vasoconstricteur par les cellules métastatiques de cancer de la prostate^{328, 329}. De nombreux modèles animaux ont permis de confirmer et de compléter cette observation. Un fibrosarcome osseux utilisé comme modèle pour étudier la douleur induite par ET-1 a permis de mettre en évidence que l'injection du peptide provoquait un effet local nociceptif, suggérant que l'ET-1 libérée par une tumeur métastatique osseuse entraînait le même type de douleur chez un patient³³⁰. Plus tard, il a été montré que l'ET-1 endogène produite par une tumeur osseuse dans un modèle murin entraînait en effet une hyperalgésie et que par ailleurs l'injection de BQ123 avant administration d'ET-1 diminuait la douleur, incriminant donc ET_AR dans la réponse nociceptive³³¹. De même, l'administration d'atrasentan, antagoniste chimique oral spécifique d'ET_AR, diminue l'hyperalgésie induite par ET-1³³². L'injection d'ET-1 conduirait également une sensibilisation neuronale, provoquant une activité spontanée des fibres C, connues pour leur implication dans les mécanismes de douleur, corrélée avec la progression du cancer³³³. L'utilisation d'antagonistes d'ET_BR, contrairement à ce qui est observé pour ET_AR, augmente la douleur³³⁴. Lorsqu'il est activé, ET_BR, présent à la surface des kératinocytes, induirait la sécrétion d'opioïdes³³⁵ pour produire un effet analgésique, inhibé par l'utilisation du naloxone (antagoniste des récepteurs aux opioïdes)^{336, 337}. Les kératinocytes pourraient donc servir de réserve endogène d'opioïdes libérés par l'activation d'ET_BR. Alors que l'activation d'ET_AR induit la douleur au sein de la métastase osseuse, relayée par les fibres nerveuses, l'action d'ET_BR sur le microenvironnement tumorale est quant à elle opposée, l'activation du récepteur ayant pour effet la libération de β -endorphines agissant sur les récepteurs périphériques aux opiacés dans le microenvironnement tumoral³³⁵. En terme de traitement de la douleur, si la réponse aux opiacés est dans un premier temps efficace, plus tard, un phénomène de tolérance s'installe chez les patients atteints de métastase osseuse. L'amélioration de l'analgésie ciblée chez les patients atteints de cancers avancés pourrait donc passer par l'utilisation de molécules ciblant de façon

spécifique ET_AR.

3. L'axe endothéline, cible de la thérapie anticancéreuse

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'importance de la signalisation de l'axe endothéline dans les différentes étapes du développement du cancer, de l'initiation à la colonisation métastatique. De surcroît, l'ET semble directement liée à la résistance de la tumeur à certains agents thérapeutiques. Aussi les récepteurs des ET se sont-ils naturellement imposés comme de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cancer.

3. 1. Impact des modulateurs pharmacologiques de l'axe endothéline sur la progression tumorale

De par son implication dans la progression tumorale, l'axe endothéline constitue une possible cible pour la thérapie anti-cancéreuse. Diverses molécules, souvent mises au point dans le but d'une utilisation dans le cadre des maladies cardiovasculaires, sont disponibles pour la recherche sur le cancer. L'axe endothéline peut être ciblé de diverses façons : par des inhibiteurs des enzymes de conversion, requises pour la génération du peptide actif, ou par des antagonistes, sélectifs ou non, des récepteurs. Dans un premier temps, les modulateurs de nature peptidique, comme le BQ123 et le BQ788, ont été utilisés en recherche fondamentale et pré-clinique. Puis, comme nous l'avons vu précédemment, des modulateurs chimiques non-peptidiques, les « -santan », utilisés en premier lieu dans les maladies cardiovasculaires, ont également été testés dans différents cancers humains. Les effets de tous ces antagonistes des récepteurs des ET ont fait l'objet de nombreuses études.

Les BQ123 et BQ788 (Banyu Pharmaceutical Co ; Merck), antagonistes respectifs d'ET_AR et ET_BR, ont été et sont encore beaucoup utilisés en recherche fondamentale dans le domaine de la cancérologie. Nous avons vu tout au long de cette seconde partie introductive qu'ils ont grandement participé à la mise en évidence des propriétés pro-tumorigènes des récepteurs ET_AR et ET_BR. Le BQ123 a montré son efficacité sur la croissance, la prolifération, la survie, la migration et l'invasion tumorale³³⁸. Les études pré-cliniques menées sur le BQ788 ont quant à elles mis en évidence l'implication pro-tumorigène d'ET_BR dans le cas du mélanome et du

gliome^{71, 72, 273}. En effet, le BQ788 aurait une action inhibitrice sur la croissance de lignées de mélanomes humains ainsi qu'un effet pro-apoptotique^{71, 72}. Le BQ788 a aussi permis de mettre en évidence l'implication d'ET_BR dans le contrôle de la vasodilatation des vaisseaux alimentant la tumeur. L'activation d'ET_BR pourrait donc permettre d'augmenter l'accès d'agents thérapeutiques au sein de la tumeur³³⁹. En raison de leurs coût et difficulté d'administration, nécessairement par voie parentérale, les BQ123 et BQ788 n'ont pas été privilégiés pour être utilisés par la suite, en essais cliniques.

L'antagoniste le plus utilisé est l'atrasentan, ou ABT-627 (Abbott Laboratories). Cette petite molécule antagoniste d'ET_AR inhibe la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose des cellules de lignées issues de différents cancers^{266, 340, 341}. Dans des lignées de cancer ovarien, l'atrasentan inhibe l'expression du VEGF³⁴¹. Il réduit également le caractère invasif de lignées de cancer du sein³⁴².

Le deuxième inhibiteur oral de l'axe endothéline le plus utilisé en recherche oncologique est le zibotentan ou ZD4054 (Astra Zeneca)³³⁸. Les expériences de compétition de liaison *in vitro* suggèrent que le zibotentan serait un inhibiteur d'ET_AR moins puissant que les autres inhibiteurs sélectifs développés, ce qui ne préjuge pas pour autant de son activité *in vivo*. En revanche, il a pour avantage sa grande sélectivité pour ET_AR. Si cet antagoniste spécifique n'a pas montré d'effet anti-prolifératif sur les lignées cellulaires de cancer du sein³⁴³, celui-ci a été mis en évidence sur des lignées cellulaires de carcinome ovarien²⁸⁸. De plus, sur ces mêmes lignées ovariennes, il a inhibé l'invasion, annulé le phénotype mésenchymateux acquis lors de l'EMT, diminué l'angiogenèse et la transactivation de l'EGFR^{288, 297, 344}.

Le bosentan (Actelion Pharmaceuticals Ltd) est lui un antagoniste qui inhibe l'action des ET en ciblant de façon non sélective les deux récepteurs ET_AR et ET_BR²³⁷. Cet inhibiteur inhibe la prolifération, diminue la viabilité cellulaire et la synthèse d'ADN et induit l'apoptose dans des lignées cellulaires de mélanome³⁴⁵.

En plus de leurs effets *in vitro*, ces antagonistes des récepteurs des ET ont prouvé leur efficacité dans des modèles pré-cliniques *in vivo*.

Le BQ123 a par exemple montré l'implication de l'axe ET-1/ET_AR dans la métastase osseuse et hépatique grâce à des modèles animaux^{69, 70}. Les résultats obtenus *in vitro* avec le BQ788 ont été vérifiés *in vivo* : l'antagoniste inhibe la croissance de xénogreffes de mélanome chez la souris^{71, 72}.

Dans des modèles animaux de xénogreffes de cancer ovarien, l'atrasentan et le zibotentan inhibent de façon significative la croissance tumorale et ce de façon aussi

efficace qu'un taxane utilisé couramment en chimiothérapie, le paclitaxel^{288, 341}. L'atrasentan bloque également la croissance des cellules de carcinome nasopharyngé xénogreffées, ce qui correspond à une diminution de l'ordre de 60% du volume de la tumeur²⁶⁶. Cet effet réducteur du volume tumoral a également été montré avec le zibotentan dans le cas du cancer du sein³⁴³. Des études ont également mis en évidence que l'atrasentan diminuait la métastase osseuse du cancer du sein chez la souris³⁴⁶. Dans différents cancers, le zibotentan a montré un effet anti-angiogénique³³⁸.

Certains modèles pré-cliniques proposent l'utilisation combinatoire de ces antagonistes avec d'autres molécules couramment utilisées en chimiothérapie. Par exemple, l'administration conjointe du zibotentan et du paclitaxel (un taxane) ou du géfitinib (inhibiteur de l'EGFR) induit un effet anti-tumoral additif des molécules, à la fois sur la croissance de la tumeur et la métastase, dans un modèle de carcinome ovarien^{288, 344, 347}. La combinaison l'atrasentan/docétaxel (un taxane) provoque quant à elle une diminution de 90% du volume de la tumeur xénogreffée prostatique chez la souris²⁸⁵.

D'autres antagonistes ont été utilisés *in vivo*, comme le A-182086, ciblant les deux récepteurs, qui a montré un effet anti-prolifératif total sur un modèle animal de sarcome de Kaposi³⁴⁸. Le YM-598 (Astellas Pharma), antagoniste spécifique d'ET_{AR} développé à partir du bosentan, induit la réduction de la croissance tumorale et de la métastase hépatique dans un modèle *in vivo* de cancer gastrique³⁴⁹. Il a également fait ses preuves en tant que réducteur de la nociception induite par ET-1³³².

3. 2. Essais cliniques autour de l'axe endothéline dans le cancer

En dépit des résultats pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* particulièrement prometteurs des antagonistes de la classe des « -sentan » et des efforts investis dans la mise en place d'essais cliniques à l'échelle mondiale, les résultats obtenus jusqu'à maintenant ont cependant été décevants (**Figure 16**).

En majorité, ces essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de cancer de la prostate. Les plus récentes études en date sont celles du programme de phase III ENTHUSE (pour *EndoThelin A USE*). Ce programme avait pour objectif l'évaluation de l'efficacité et de la sûreté du zibotentan, combiné ou non au docetaxel, versus un placebo ou le docetaxel, chez des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration, métastatique ou non³⁵⁰⁻³⁵³. Quelle que soit l'étude

considérée, la conclusion fut sans appel puisque dans chacune d'entre elles l'administration journalière de 10 mg de zibotentan n'a pas permis une augmentation significative de la survie des patients, entraînant l'abandon des études reposant sur le zibotentan comme potentiel traitement du cancer de la prostate.

L'atrasentan qui avait donné des résultats encourageants dans le cancer de la prostate en phase I/II a lui aussi échoué en phase III d'essai clinique³⁵⁴⁻³⁵⁶.

Une étude clinique de phase II a également été menée dans laquelle le bosentan a été utilisé comme traitement du mélanome métastatique (stade IV). Le résultat fut tout aussi décevant : la maladie fut stabilisée chez seulement 6 patients sur 32³⁵⁷. Une seconde étude a eu pour objet l'évaluation de l'efficacité du bosentan combiné à une chimiothérapie (dacarbazine). Ici, l'administration de l'antagoniste fut sans effet sur la progression tumorale³⁵⁸.

Par ailleurs, l'utilisation de ces antagonistes non-peptidiques est à l'origine de divers effets secondaires parmi lesquels une toxicité hépatique³⁵⁷, observée notamment avec le bosentan et concernant jusqu'à plus de 20% des patients, de l'œdème périphérique dans le cas des antagonistes d'ET_AR³⁵⁹ et un risque cardiaque augmenté^{350, 355}, des maux de tête, des nausées, des diarrhées mais aussi de l'alopécie.

L'ensemble des résultats des essais cliniques menés sur l'atrasentan, le bosentan et le zibotentan ne plaide pas en faveur de ces antagonistes, bien que l'axe endothéline ait été identifié comme un acteur crucial de la progression tumorale. La porte reste donc ouverte à d'autres types de thérapies anti-cancéreuses ayant pour cible les récepteurs des ET et offrant des résultats cliniques satisfaisants ; pourquoi pas les anticorps monoclonaux ?

Composé (Compagnie)	Cible	Essai clinique / Phase	Traitement	Tumeur	Résultats
Atrasentan (Abbott)	ET _A R	Carducci (2003) / II	Atrasentan (monothérapie)	HRPC	Augmentation TTP
		Michaelson (2006) / II	Atrasentan + acide zolédronique	mPC	Association sans bénéfice
		Carducci (2007) / III	Atrasentan (monothérapie)	mCRPC	Sans bénéfice
		Chiappori (2008) / II	Atrasentan + paclitaxel + carboplatine	NSCLC	Association sans bénéfice
		Nelson (2008) / III	Atrasentan (monothérapie)	CRPC	Sans bénéfice
		Armstrong (2008) / III	Atrasentan + docetaxel	mCRPC	Association sans bénéfice
		Witteveen (2010) / II	Atrasentan + doxorubicine liposomale pégylé	ovaire#	Possible amélioration de la survie
		Quinn (2013) / III	Atrasentan + docetaxel	mCRPC	Association sans bénéfice
		NCT00134056 / III	Atrasentan + docetaxel + prednisone	mPC	NR
Bosentan (Actelion)	ET _{A/B} R	Kefford (2007) / II	Bosentan (monothérapie)	MM	Possible stabilisation du cancer
		Kefford (2010) / II	Bosentan + dacarbazine	MM	Association sans bénéfice
Zibotentan (Astra Zeneca)	ET _A R	James (2009) / II	Zibotentan (monothérapie)	mCRPC	Sans effet sur le TTP, augmentation de la survie
		Chouaid (2011) / II	Zibotentan + pemetrexed	NSCLC	Association sans bénéfice
		Nelson (2012) / III	Zibotentan (monothérapie)	mCRPC	Sans bénéfice
		Cognetti (2013) / II	zibotentan + carboplatine/ paclitaxel	ovaire*	Association sans bénéfice
		Miller (2013) / III	Zibotentan (monothérapie)	CRPC	Sans bénéfice
		Fizazi (2013) / III	Zibotentan + docetaxel	mCRPC	Association sans bénéfice
YM598 (Astellas Pharma)	ET _A R	NCT00050297 (2012) / II	YM598 (monothérapie)	PC	NR
		NCT00048659 (2012) / II	YM598 + mitoxantrone + prednisone	HRPC	NR

Figure 16. Antagonistes des récepteurs des ET utilisés en phases cliniques II et III en thérapie anticancéreuse. CRPC : castration-resistant prostate cancer ; HRCPC : hormone-refractory prostate cancer ; m : metastatic ; MM : metastatic melanoma ; NSCLC : non-small cell lung cancer ; PC : prostate cancer ; TTP : time to progression ; * : sensitive to platinum ; # : platinum-resistant.

C. Immunothérapie anti-cancéreuse

1. Les traitements contre le cancer

(Sources : Institut national du cancer, Institut Gustave Roussy)

L'arsenal thérapeutique actuellement à disposition pour traiter le cancer se compose de la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et également de la thérapie ciblée. Le choix du traitement, qui peut être une monothérapie ou une thérapie combinée, varie en fonction des caractéristiques tumorales, notamment du type de cancer, de l'accessibilité de la tumeur ou encore du stade de progression de la maladie. Selon ces différents critères déterminés, le corps médical pourra s'orienter vers la thérapie la plus efficace pour traiter le patient.

1. 1. Les traitements de routine

a. La chirurgie

La chirurgie est un acte médical qui reste à l'heure actuelle extrêmement privilégié dans le traitement des cancers, d'autant plus qu'il bénéficie, entre autres, des progrès réalisés en imagerie et robotique opératoire. Ce traitement local qui consiste en l'exérèse de tumeurs dites solides et non métastasées n'est donc pas adapté aux cancers touchant le système lymphatique ou sanguin et convient moins bien aux cancers à des stades trop avancés qui ont diffusé à distance de la tumeur primaire. En plus de l'ablation de la tumeur, cet acte présente comme intérêt de poser ou de confirmer un diagnostic par une analyse histologique du tissu, ce qui permet une évaluation de la gravité de la maladie et, le cas échéant, le choix d'un traitement complémentaire adapté. En effet, la chirurgie est bien souvent associée à la chimiothérapie ou à la radiothérapie.

La chirurgie curative consiste à retirer intégralement la tumeur et éventuellement, par précaution, le tissu avoisinant. Elle peut également s'accompagner de l'exérèse des ganglions lymphatiques proches de la tumeur, appelés ganglions sentinelles. Par ailleurs, en cas d'exérèse large, une reconstruction peut être proposée.

La chirurgie prophylactique est proposée chez certaines personnes lorsqu'il existe un risque élevé de développer un cancer du fait de mutations génétiques. Elle consiste en l'ablation d'un organe sain afin de prévenir l'apparition d'un cancer. Parmi les gènes de prédisposition majeure on compte *BRCA1* et *BRCA2* qui jouent un rôle important dans les cancers héréditaires du sein et l'ovaire³⁶⁰ mais également dans le cancer de la prostate³⁶¹, et dont la mutation peut justifier ce genre de chirurgie³⁶². Les mutations des gènes *hMSH2* et *hMLH1* sont quant à elles déterminantes dans le développement du cancer colorectal^{363, 364}.

Enfin, il est possible de réaliser une chirurgie dite palliative, lorsque la tumeur a diffusé et que son traitement nécessitera, malgré tout, une thérapie générale. Ce type de chirurgie a pour but de préserver une fonction vitale qui se trouve affectée par la progression du cancer ou encore de soulager des douleurs, qui peuvent notamment être de nature osseuses, et ainsi prolonger la vie du malade dans des conditions satisfaisantes.

b. La radiothérapie

La radiothérapie repose sur l'exposition des cellules cancéreuses constituant la tumeur à des rayonnements, également appelés rayons ou radiations, en préservant, dans la mesure du possible, les tissus sains avoisinants. L'altération de l'ADN dû aux rayonnements provoque le blocage des mécanismes de multiplication des cellules et leur destruction. Ce type de traitement fréquent du cancer peut notamment être associé à la chirurgie et à la chimiothérapie.

L'administration de la radiothérapie se fait selon deux voies principales. La voie externe, la plus courante, repose sur l'émission de rayons (photons de haute énergie ou électrons) en faisceau, par une machine (un accélérateur ou un accélérateur linéaire de particules) ; ces rayons traversent la peau du malade et atteignent la tumeur cible. La voie interne consiste soit en l'implantation d'une source radioactive à l'intérieur du corps du malade en contact avec la tumeur, on parle alors de curiethérapie, soit en une administration par voie orale ou systémique de produits radioactifs, dans ce cas on parle de radiothérapie métabolique. Selon les cas, la radiothérapie interne utilise différents radioéléments : iridium-192, césium-137, iode 131, phosphore 32, iode-125 et palladium-103.

La radiothérapie est un domaine qui bénéficie des progrès réalisés en imagerie, informatique et robotique, ce qui en fait une technique de très haute précision.

Parallèlement à la radiothérapie se développe actuellement la protonthérapie : elle repose sur l'utilisation de protons et d'accélérateurs particuliers appelés cyclotrons.

c. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique, basé sur l'utilisation de molécules cytotoxiques, qui vise à détruire les cellules cancéreuses, quelle que soit leur localisation dans l'organisme. Bien que certains médicaments de chimiothérapie s'administrent par voie orale, injection intramusculaire ou sous-cutanée, la grande majorité d'entre eux sont donnés par voie intraveineuse. Les agents chimiothérapeutiques, qui peuvent être utilisés en association, sont de nature et d'action diverses. Il existe des anti-métabolites (e.g. le fluoro-uracile ou 5-FU), des agents alkylants ou des modificateurs de l'ADN (e.g. cis-platine, l'irinotécan, la cyclophosphamide) et des poisons du fuseau (ex : le docétaxel et le paclitaxel, dont nous avons vu qu'ils étaient très utilisés en essais pré-cliniques). La chimiothérapie cible plus précisément les cellules en cours de division, elle n'est donc pas spécifique des cellules cancéreuses présentes dans l'organisme. Les cellules à renouvellement rapide se trouvent de ce fait atteintes par le traitement ; parmi elles on compte les cellules du bulbe pileux, ce qui cause une alopécie, effet secondaire bien connu de la chimiothérapie. A l'heure actuelle, les effets indésirables de la chimiothérapie sont bien maîtrisés par les médicaments dits de « support ».

Lorsqu'elle est débutée avant une intervention chirurgicale, la chimiothérapie est qualifiée de « néo-adjuvante ». Elle permet la réduction du volume de la tumeur et ainsi de pratiquer des opérations moins mutilantes. Quand elle est commencée après une chirurgie elle est dite « adjuvante ». A ce stade de la thérapie anti-cancéreuse elle a pour but d'éliminer les cellules malignes encore présentes dans l'organisme. Cette approche curative systémique est essentielle dans le traitement du cancer métastatique.

d. L'hormonothérapie

Certains types de cancers, par exemple du sein ou de la prostate, voient leur croissance stimulée par des hormones ; ils sont dits hormonodépendants. Dans le cas de ces cancers, l'hormonothérapie est une stratégie visant à empêcher l'action stimulante des hormones sur les cellules cancéreuses, dans le but d'inhiber la progression tumorale. Elle est souvent utilisée conjointement à la chirurgie.

Il est possible d'empêcher la sécrétion d'hormones jouant un rôle dans la prolifération des cellules tumorales en procédant par exemple à l'ablation de la glande productrice. Par ailleurs, des anti-hormones, prenant la place des hormones naturelles, peuvent être utilisées. Le tamoxifène, modulateur des récepteurs des œstrogènes, est par exemple très largement utilisé dans la thérapie du cancer du sein hormonodépendant.

e. La thérapie ciblée

On appelle thérapies ciblées l'ensemble des nouveaux traitements qui consistent à cibler de façon précise certaines caractéristiques inhérentes aux cellules cancéreuses. Le développement de ce type de thérapie a été permis par les progrès réalisés en terme de connaissance des tumeurs, ce qui a abouti à l'identification précise des rôles joués par un certain nombre de molécules dans la progression tumorale, de la tumeur primitive comme des métastases. A la différence d'autres traitements systémiques comme la chimiothérapie, ce ciblage permet de restreindre au mieux l'action des molécules thérapeutiques utilisées aux cellules tumorales et de ce fait, prétendre d'une part à une plus grande efficacité et d'autre part à des effets secondaires réduits.

Ce type de traitement peut viser des cibles cellulaires favorisant par exemple la prolifération, l'angiogenèse ou encore la survie, effets cellulaires dont nous avons précédemment vu qu'ils étaient induits par l'activation de l'axe endothéline.

On peut citer comme exemple de thérapie ciblée l'imatinib, commercialisé sous le nom de Glivec®. Ce médicament, qui appartient à la classe des inhibiteurs de tyrosine kinases (*tyrosine kinase inhibitors*, TKI) et cible spécifiquement BCR-ABL, c-KIT et PDGFRA, est l'un des premiers à avoir montré tout le potentiel des thérapies ciblées dans la lutte contre le cancer³⁶⁵.

Les anticorps monoclonaux (AcM ou mAb pour *monoclonal antibody*) tels que l'ipilimumab, immunomodulateur anti-CTLA-4, et le trastuzumab, anti HER2/neu, commercialisé sous le nom de l'Herpectin®, sont des exemples particuliers de thérapies ciblées. La partie C 6. de cette introduction sera dédiée à ces AcM.

1. 2. L'immunothérapie dans le traitement des cancers

La surveillance du système immunitaire vis-à-vis d'un cancer est notamment stimulée par la présence d'antigènes associés à la tumeur (*tumor-associated antigens*,

TAA). Cependant, cette surveillance entraîne un processus dynamique appelé « *immunoediting* ». Il débute par l'élimination des cellules tumorales, grâce au système immunitaire, se poursuit par une phase d'équilibre durant laquelle la tumeur se trouve en latence et se termine par un échappement de la tumeur au système immunitaire, lié à l'émergence de variants tumoraux insensibles ainsi qu'au détournement du système immunitaire lui-même qui promeut la progression du cancer³⁶⁶. Finalement, les cellules tumorales se retrouvent ainsi être faiblement antigéniques, c'est à dire sont mal ou pas reconnues par le système immunitaire comme étrangères.

L'immunothérapie anti-cancéreuse, qui repose sur cette lacune du système immunitaire, consiste soit à fournir des effecteurs anti-tumoraux, soit à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale du patient. Ce type de traitement s'utilise de façon combinatoire à d'autres approches thérapeutiques³⁶⁷. On distingue différents types d'immunothérapie. Selon les cas elle peut 1) reposer sur une stimulation générale du système immunitaire ou être spécifique d'antigènes tumoraux, 2) consister en l'administration d'effecteurs, moléculaires ou cellulaires, ou d'antigènes. Les principales approches immunothérapeutiques développées ou en cours de développement sont résumées ci-dessous.

a. L'immunothérapie par les cytokines

L'immunothérapie basée sur l'administration de cytokines, protéines aux propriétés immunomodulatrices, a pour but de stimuler le système immunitaire du malade. Cette stimulation est de nature non spécifique.

Les cytokines sont généralement administrées de façon systémique. Pour ne citer que ces deux exemples, l'interleukine 2 (IL-2) (puissant facteur de croissance des cellules T) et l'interféron- α (IFN- α) (médiateur important de l'immunité anti-virale) sont utilisés dans le traitement du mélanome métastatique et du carcinome des cellules rénales, tumeurs généralement réfractaires à la chimiothérapie³⁶⁸⁻³⁷¹.

Un autre exemple est le facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF)- α . En plus de son activité anti-tumorale, le TNF- α est connu pour induire des chocs septiques, c'est pourquoi il doit être délivré localement pour traiter les sarcomes des membres³⁷².

En raison de leur absence de spécificité, les cytokines présentent des effets secondaires sévères, tels que de l'hypotension, des vomissements ou de la fièvre³⁷³. Cette constatation a ouvert la voie à une immunothérapie anti-tumorale mieux ciblée,

dans le but d'optimiser la réponse locale et de limiter l'effet toxique des cytokines à l'échelle de l'organisme.

b. L'immunothérapie adoptive de lymphocytes T

L'immunothérapie adoptive de lymphocytes T (L_T) (généralement des TIL) repose sur le prélèvement de cellules immunitaires du patient qui sont ensuite manipulées *ex vivo*, c'est à dire sélectionnées et amplifiées, et enfin qui lui sont réinjectées en vue d'une action anti-tumorale. On parle aussi de transfert adoptif de L_T autologues.

En effet, l'augmentation des L_T dirigés contre la tumeur et leur différenciation en L_T mémoires représente un des enjeux majeurs de l'immunothérapie³⁷⁴. Le transfert adoptif de TIL autologues a notamment montré des résultats particulièrement encourageants lors d'essais cliniques menés chez des patients atteints de mélanome métastatique³⁷⁵.

Il existe néanmoins des limitations au transfert adoptif des TIL, comme leur accessibilité chez le patient ou les difficultés de les cultiver *ex vivo*, comme c'est le cas chez près de 15% des malades atteints de mélanome³⁷⁶.

A l'inverse, certaines stratégies permettent de contourner les difficultés de manipulation *ex vivo* de ces cellules. L'une d'elles consiste à induire l'expression de récepteurs d'antigènes des cellules T (*T-cell receptor*, TCR) transgéniques, spécifiques d'antigènes cancéreux choisis, dans les lymphocytes du sang périphérique du patient, via des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux³⁷⁷.

c. L'immunothérapie par vaccination

Les thérapies vaccinales anti-cancéreuses, préventives comme curatives, ont pour but d'augmenter la réponse immunitaire de l'hôte contre la tumeur. Elles reposent notamment sur l'induction de L_T spécifiques de la tumeur. Les stratégies vaccinales anti-cancéreuses étant extrêmement nombreuses, seuls quelques exemples sont abordés dans cette partie.

La vaccination anti-cancéreuse à titre prophylactique s'est montrée efficace dans de nombreux modèles murins³⁷⁸. En raison de la tolérance de la tumeur par le système immunitaire, la vaccination chez le patient déjà atteint de cancer, à un stade avancé, est quant à elle un véritable challenge. Différentes stratégies pour déclencher une réponse immunitaire contre le cancer ont été envisagées comme la vaccination

contre des antigènes spécifiques, l'utilisation de cellules dendritiques³⁷⁹ ou de cytokines³⁸⁰.

Chez les patients atteints de cancer à des stades avancés, la première génération de vaccins de nature peptidique et protéique s'est montrée peu apte à stimuler les L_T effecteurs³⁸¹.

Co-administrées aux vaccins, les cytokines ont été utilisées comme des adjuvants³⁸⁰. Elles permettent d'améliorer la réponse immunitaire en favorisant le recrutement et la maturation de divers effecteurs cellulaires. Les rôles des IL-2, IL-12, de l'IFN- α et du GM-CSF (pour *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) ont notamment été étudiés.

Les cellules dendritiques (*dendritic cell*, DC), principales cellules présentatrices de l'antigène, jouent un rôle crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, leur dysfonctionnement, qui est incriminé dans l'échappement immunitaire, a été mis en évidence chez les malades du cancer³⁸². Différentes études ont consisté à charger des cellules dendritiques avec des TAA *ex vivo*, en pulsant avec des peptides, des lysats tumoraux totaux ou encore des ARN codant des antigènes tumoraux³⁷⁴. La FDA a récemment approuvé l'utilisation du Sipuleucel-T (Provenge®), le premier vaccin cellulaire, pour le traitement du cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration. Le Sipuleucel-T est un vaccin basé sur les cellules mononucléaires du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) autologues. Ces cellules sont chargées *ex vivo* avec une protéine de fusion PAP-GM-CSF, constituée d'un antigène (PAP, phosphatase acide prostatique) et d'un facteur de croissance (GM-CSF). Le Sipuleucel-T induirait une réponse immune spécifique de l'antigène et de ce fait la destruction des cellules de prostate cancéreuses³⁸³.

Des études suggèrent fortement que la combinaison de la thérapie vaccinale à la thérapie adoptive améliorerait l'efficacité des traitements³⁷³. Ces deux modes d'immunothérapie anti-cancéreuse font actuellement l'objet de nombreuses recherches.

d. L'immunothérapie par les anticorps

L'immunothérapie basée sur les Ac occupe une place de plus en plus importante dans le traitement des tumeurs hématologiques mais également solides. Elle inclut l'utilisation d'Ac « nus » ou de fragments d'Ac, d'Ac conjugués à des molécules cytotoxiques, de radio-immunoconjugués ou encore d'Ac bi ou multispécifiques³⁸⁴.

Ces Ac peuvent être dirigés contre des molécules impliquées dans la progression tumorale, en ciblant des TAA. Ils peuvent notamment inhiber la prolifération cellulaire ou la survie, en empêchant par exemple la liaison d'un ligand ou la dimérisation de récepteurs, impactant de ce fait la signalisation en aval. Ils peuvent également cibler le microenvironnement tumoral, en impactant l'angiogenèse ou en jouant un rôle sur le recrutement du système immunitaire au niveau des cellules tumorales. Ces Ac peuvent aussi agir de façon plus générale à l'échelle de l'organisme, par exemple en ayant une action immunomodulatrice. Les mécanismes d'action les plus courants des anticorps monoclonaux (AcM), sont la cytotoxicité cellulaire (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), la phagocytose (*antibody-dependent phagocytosis*, ADPh) et l'activation du complément (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC)³⁸⁵. Les AcM déjà disponibles sur le marché font l'objet d'une utilisation seule ou combinée à d'autres thérapies comme la chimiothérapie ou la radiothérapie³⁸¹. Bien que cela puisse être le cas (comme nous le verrons par la suite avec l'ipilimumab), le but de cette immunothérapie, qui consiste à injecter des Ac chez le patient, n'est pas nécessairement de stimuler l'immunité du malade.

Les AcM obtenant une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une utilisation en oncologie sont de plus en plus nombreux, ce qui reflète l'importance de cette approche thérapeutique. Ce sont de ces AcM dont il s'agit dans la suite de cette introduction.

2. Généralités sur les anticorps

2. 1. Les anticorps en quelques dates

C'est en 1890, à Berlin, qu'Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato ont découvert l'existence dans le sang d'un agent capable de neutraliser les toxines diphtériques (antitoxines). Rapidement a émergée la notion d'Ac ou « *Antikörper* », en référence à la capacité de cet agent à discriminer deux substances immunes. Puis, c'est la substance induisant l'Ac qui a elle-même été nommée antigène, pour la contraction de « *Antisomatogen* » et « *Immunkörperbildner* ». Ses travaux sur la thérapie sérique (voir C. 3. 1.) ont valu à Emil Von Behring d'être le premier prix Nobel de physiologie ou médecine en 1901. En 1908, ce sont Paul Ehrlich et Ilya Mechnikov qui furent récompensés pour leurs travaux sur l'immunité. Entre les

années 30 et 40, la description des Ac et la compréhension de leur mécanisme de production se sont encore affinés : John Marrack formula l'hypothèse de fixation d'un Ac à un antigène ; Arne Tiselius et Elvin A. Kabat parvinrent à isoler, par électrophorèse, une fraction de globuline-g contenue dans le sérum immunisé contre un antigène, qui, étant déplétée par une incubation avec l'antigène, fut nommée immunoglobuline ; il fut mis en évidence que les Ac étaient produits par les lymphocytes B. Plus tard, en 1972, un prix Nobel vint couronner les travaux de Gerald Edelman et Rodney Porter sur la structure chimique des Ac. Enfin, Niels Jerne, Georges Köhler et César Milstein furent récompensés par un prix Nobel en 1984 pour leurs travaux sur les AcM, sur lesquels nous reviendrons dans cette introduction.

2. 2. Structure des anticorps

Les immunoglobulines (Ig) sont les molécules des lymphocytes B (L_B) dotées de la reconnaissance antigénique. Si chaque L_B n'est capable de produire qu'une seule spécificité d'Ig, le répertoire des Ig est particulièrement vaste. Ceci est en partie dû à des phénomènes de réarrangement des gènes des immunoglobulines, qui ne seront pas abordés ici³⁸⁶. Les Ig fixées à la membrane des L_B constituent les récepteurs de cellules B (*B-cell receptor*, BCR). Les plasmocytes, cellules B arrivées au terme de leur différenciation, sécrètent des Ig solubles de même spécificité antigénique, sous forme d'Ac, et ce en grande quantité. Cette sécrétion est la principale fonction effectrice des cellules B.

L'Ac, que l'on peut schématiquement représenter par un Y, se compose de trois parties égales, globulaires, reliées entre elles par des segments flexibles. Il existe une dualité fonctionnelle de l'Ac, identifiable structuralement. La première propriété de l'Ac est la fixation spécifique à un antigène (Ag). La région de l'Ac mise en jeu dans la reconnaissance de l'Ag est très différente d'un Ac à l'autre ; on parle de région variable, ou région V, correspondant aux extrémités des deux bras de l'Y. Théoriquement, chez un individu, la diversité du répertoire des Ac est assez étendue pour permettre la reconnaissance spécifique de n'importe quelle structure. La seconde propriété de l'Ac consiste au recrutement d'autres molécules et de cellules du système immunitaire. La région de l'Ac impliquée dans ces mécanismes effecteurs ne varie pas dans les mêmes proportions ; il s'agit de la région constante, ou région C, qui correspond à la tige de l'Y. La propriété de médiation de ces fonctions effectrices

est inexistante dans le cas des BCR, puisque la région C se trouve insérée dans la membrane du L_B.

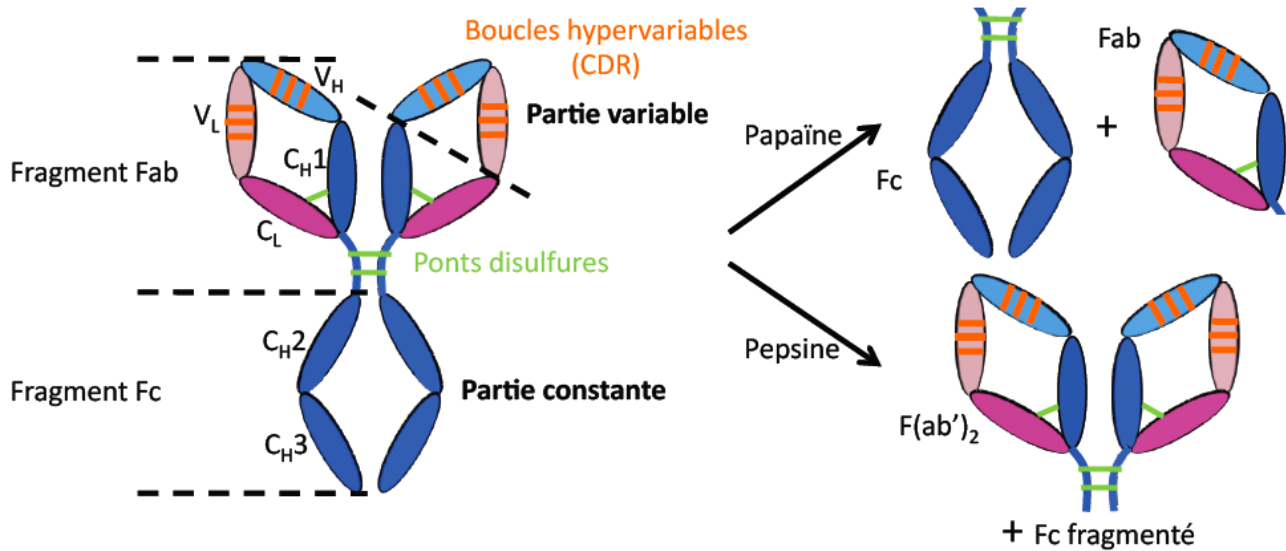


Figure 17. Structure schématique d'une immunoglobuline G. Elle se compose de deux chaînes lourdes (bleu) et de deux chaînes légères (rose) reliées entre elles par des ponts disulfures (vert). Une digestion partielle de l'immunoglobuline peut être réalisée par des protéases (papaïne et pepsine).

Tous les Ac sont constitués de paires de chaînes polypeptidiques lourdes et légères. Ces protéines sont regroupées sous l'appellation générique d'immunoglobuline (Ig). La structure générale des Ig sera décrite ici à partir de la classe des IgG (voir C. 2. 3.), qui sont les Ig les plus abondantes dans le plasma (**Figures 18 et 19**). Les IgG sont des molécules d'environ 150 kDa. Elles se composent chacune de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L), respectivement de 50 et 25 kDa environ. Les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles par des ponts disulfures et chacune d'entre elles est reliée par un pont disulfure à une chaîne légère. Les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères d'un Ac donné sont identiques, ainsi cet Ac possède deux sites de liaison capables de lier deux structures identiques (**Figure 17**).

Chacune des quatre chaînes formant l'Ac est constituée d'une succession de domaines, des séquences d'environ 110 a.a., repliées en feuillets β . Ces domaines d'Ig sont au nombre de deux pour les chaînes légères et de quatre pour les chaînes lourdes. Le premier domaine, en N-terminal des chaînes, présente une forte variation entre Ac : ce sont les domaines V. Au contraire, pour une classe d'Ac donnée, les autres domaines sont constants : il s'agit des domaines C. La région V de l'Ac, qui

confère à la molécule sa capacité de liaison à l'Ag (voir C. 2. 4.), résulte de l'association des domaines variables des chaînes légères (V_L) aux domaines variables des chaînes lourdes (V_H). La région C de l'Ac est elle constituée des domaines constants des chaînes légères et lourdes, nommés respectivement C_L et C_H . Les domaines constants des chaînes lourdes sont numérotés de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale C_{H1} à C_{H3} (**Figure 17**).

L'étude de la structure des Ac a été facilitée par l'utilisation d'enzymes protéolytiques (**Figure 17**). Comme indiqué plus haut, l'Ac peut être schématisé par un Y : il est formé de trois parties globulaires de tailles égales, reliées entre elles par une portion polypeptidique flexible appelée région charnière. La digestion partielle de l'Ac par la papaine permet l'obtention de trois fragments, suite au clivage de la région charnière, du côté N-terminal des ponts disulfure reliant les deux chaînes lourdes. Deux de ces fragments d'Ac ont la capacité de lier l'Ag ; cette propriété leur vaut le nom de fragments Fab, pour *Fragment antigen binding*. Le troisième fragment, ne liant pas l'Ag, a été aisément cristallisé, d'où son nom de fragment Fc, pour Fragment cristallisable.

Un des sites de clivage de la pepsine se situe quant à lui du côté C-terminal des ponts disulfures de la région charnière. Ainsi, cette enzyme génère un fragment dimérique, $F(ab')_2$, capable de lier les Ag. Le fragment Fc est lui clivé en plusieurs peptides.

2. 3. Les différentes classes d'anticorps

L'immunisation inter-spécifique par les Ac permet l'identification de déterminants antigéniques communs et individuels des Ig³⁸⁷. Ainsi, les Ac peuvent être classés selon différents déterminants antigéniques.

- les isotypes : ces déterminants communs sont spécifiques de la région constante des l'Ac. Ils caractérisent les classes et sous-classes des chaînes lourdes et des chaînes légères (voir C. 2. 4.). Ainsi, au sein des Ig se distinguent cinq classes, déterminées par la structure de leur chaîne lourde : les immunoglobulines M (IgM), les immunoglobulines D (IgD), les immunoglobulines G (IgG), les immunoglobulines A (IgA) et les immunoglobulines E (IgE), possédant respectivement les chaînes lourdes μ , δ , γ , α et ϵ . Chez l'homme, les IgG, qui sont les plus représentées, se divisent en quatre sous-classes, IgG1, 2, 3 et 4, numérotées de la plus abondante à la moins représentée dans le plasma. La IgA, quant à elles, se subdivisent en IgA1 et IgA2. Les

IgM sécrétées sont des pentamères et les IgA existent sous forme de monomère et de dimère (**Figures 18 et 19**). Chacune des classes d'Ac présente une spécialisation pour certaines fonctions effectrices, imputable aux différences présentes dans la partie C-terminale de la chaîne lourde (ponts disulfure, sites de glycosylation, nombre de domaines C), le fragment Fc.

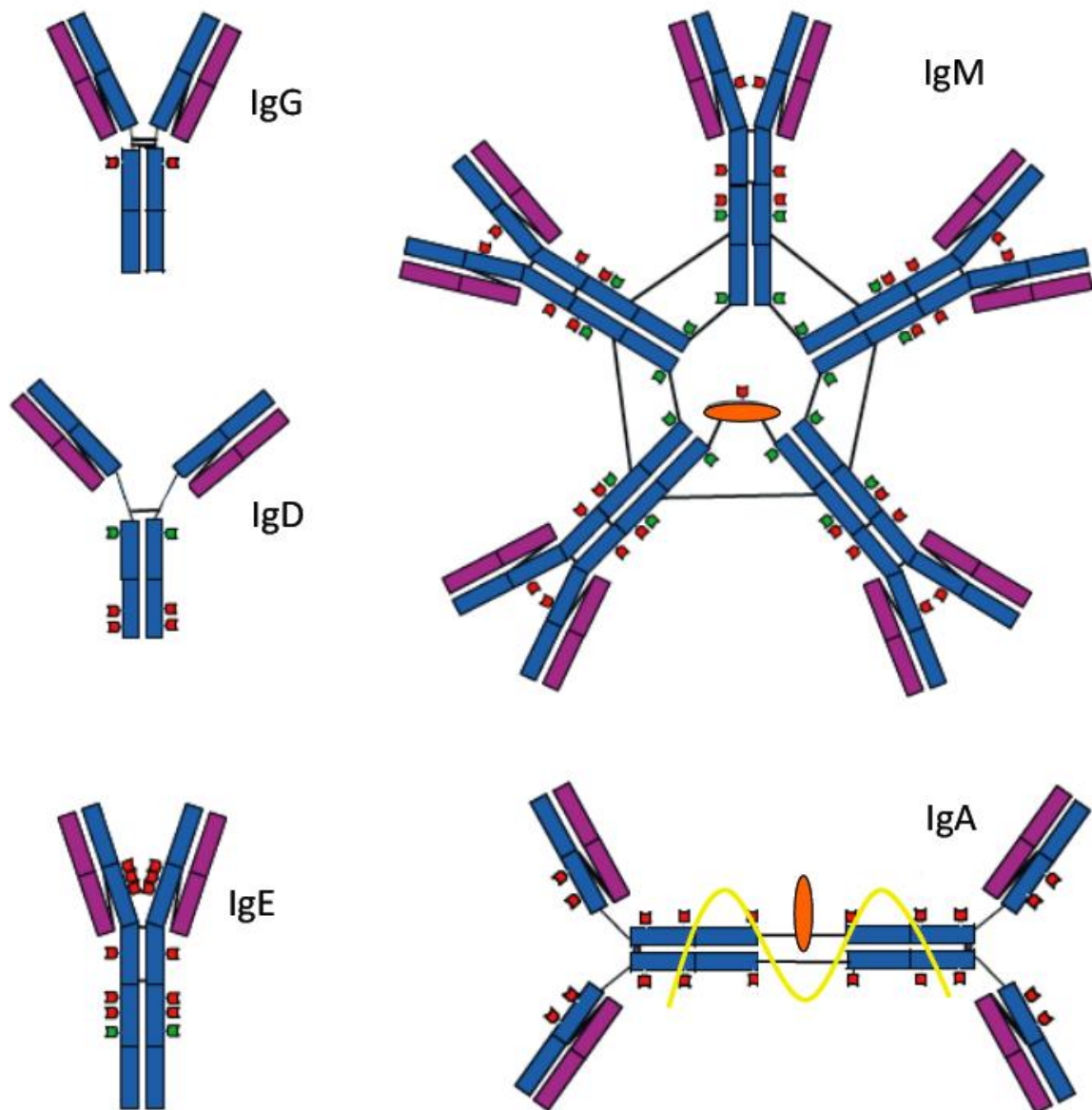


Figure 18. Structure des différentes classes d'anticorps. Les IgM et IgA peuvent former des polymères. Cette polymérisation met en jeu la région constante des immunoglobulines (Ig) et fait intervenir une chaîne J (16 kDa) (orange). Les IgM plasmatiques forment des pentamères et occasionnellement des hexamères (sans chaîne J). La polymérisation des IgA est nécessaire à leur transport au travers des épithéliums ; les dimères sont ainsi prédominants dans les sécrétions muqueuses, tandis que la forme monomérique est plus représentée dans le plasma. En plus d'une chaîne J, les dimères d'IgA présentent une composante sécrétoire (70 kDa) (jaune). Les sites de N-glycosylation (rouge) et d'oligomannose (vert) sont représentés. D'après Arnold *et al.*, 2007³⁸⁸.

Deux types de chaînes légères sont identifiés, nommées lambda (λ) et kappa (κ), dont le rapport varie en fonction de l'espèce considérée. Il ne semble pas exister de différence fonctionnelle entre les chaînes λ et κ .

- les allotypes : ces déterminants communs d'un ensemble d'individus dans une espèce donnée correspondent au polymorphisme allélique des gènes codant les Ac.

- les idiotypes : ces déterminants individuels sont présents dans les régions variables des Ig et permettent un regroupement des Ac par spécificités antigéniques.

Classe	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Sous classes	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$		$\alpha 1, \alpha 2$		
Structures	monomère	pentamère	monomère/dimère	monomère	monomère
Poids moléculaire (kDa)	150	950	160-350	170-180	190
Autres chaînes		chaîne J	chaîne J, composante sécrétoire		
Proportion sérique (%)	75	10	15	0,2	0,004
Demi-vie (jours)	21-24 ($\gamma 3 : 7$)	5-10	4-7	2-8	1-5
Activation du complément (voie classique)	$\gamma 3 > \gamma 1 > \gamma 2 > \gamma 4$	+++	-	-	-
Transfert placentaire	$\gamma 1 = \gamma 3 = \gamma 4 > \gamma 2$	-	-	-	-

Figure 19. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes classes d'immunoglobulines. D'après <http://www.imgt.org>.

2. 4. Interaction de l'anticorps avec son antigène

La région variable, formée des chaînes légères et lourdes repliées et appariées, constitue le site de liaison à l'Ag. Si cette région V diffère d'un Ac à l'autre, la variabilité n'est pas homogène au long de la séquence protéique. En effet, trois segments des domaines V_L et V_H présentent une grande variabilité : il s'agit des régions hypervariables, nommées HV1, HV2 et HV3. Les régions HV sont insérées dans quatre régions formant un cadre, dont la variabilité est moindre : FR1, FR2, FR3 et FR4 (pour *Framework Regions*). Ces dernières forment les feuillets β , assurant ainsi la conformation du domaine variable. Les régions HV, présentes au niveau des

boucles, sont quant à elles rassemblées à l'extérieur du tonneau β , à la surface de l'Ig. C'est la juxtaposition des domaines V_L et V_H et des 6 régions HV qui entraîne la formation d'un site hypervariable à l'extrémité d'un bras de l'Ac, constituant ainsi le site de liaison à l'Ag. La structure complémentaire de l'Ac, déterminant la spécificité antigénique, est donc due aux six régions HV, d'où leur nom de régions déterminant la complémentarité, CDR1, CDR2 et CDR3 (pour *Complementary-Determining Regions*) (**Figure 17**). La vision selon laquelle la spécificité de l'Ac pour son Ag n'impliquerait que la région variable de l'Ig est cependant remise en cause par des études montrant que les domaines C_H sont également impliqués dans l'affinité et la spécificité de la liaison³⁸⁹.

L'association aléatoire des chaînes légères et lourdes, nommée diversité combinatoire, est un des mécanismes à l'origine de la diversité des Ac.

La surface qui est formée par les CDR constitue le site de fixation de l'Ag et est appelée paratope. D'un Ac à l'autre, les différences entre les séquences des CDR se traduisent par une « topographie » différente de la surface de l'Ig et la fixation d'un ligand donné par complémentarité de surface.

L'épitope est la partie de l'Ag qui est reconnue par l'Ac. Dans le cas d'un Ag de nature protéique, lorsqu'un Ac est généré contre une structure se composant d'a.a. appartenant à des segments non contigus de la séquence primaire de l'Ag, mais proches dans la conformation tridimensionnelle native de la protéine, l'épitope reconnu est dit conformationnel ou discontinu. Au contraire, quand l'épitope consiste en une seule séquence polypeptidique, il est dit linéaire ou continu. Il faut cependant préciser que dans le cas où des Ac sont produits contre une protéine intacte, il est possible que certains d'entre eux ne reconnaissent pas un épitope conformationnel mais linéaire. Inversement, il est envisageable qu'un Ac produit contre un peptide soit capable de reconnaître une protéine dans sa conformation native.

Le fait que l'Ac soit capable de reconnaître une ou plusieurs parties de l'Ag (en fonction de l'épitope linéaire ou conformationnel), et ce indépendamment du reste de la structure, permet une discrimination fine de l'Ag. Au contraire, un même Ac peut être capable de reconnaître des Ag différents qui présentent des épitopes similaires ; on parle alors de réactivité croisée.

La liaison Ac/Ag est non covalente, c'est à dire qu'elle est réversible. Elle met en jeu des forces de nature différentes : interactions électrostatiques ; liaisons hydrogène ; forces de Van der Waals ; forces hydrophobes. La contribution de ces forces est fonction de l'interaction Ac/Ag considérée. Finalement, il a été mis en

évidence que seuls quelques résidus intervenaient de façon prépondérante dans la spécificité et l'affinité de l'Ac pour son Ag.

Comme dit plus haut (C. 2. 3.), les IgM et les IgA sont capables de former des polymères. Cette propriété de polymérisation joue un rôle important lors de la liaison de l'Ac à des motifs épitopiques répétitifs. En effet, une Ig présente deux sites de liaison pour un même épitope, chacun de ces sites ayant une affinité donnée. Un Ac lié à des épitopes multiples et identiques d'une cible ne se détache de sa cible qu'à la rupture de toutes les liaisons engagées. Aussi, la multiplication des sites de liaison par la formation de dimère (dans le cas des IgA) ou de pentamère (pour les IgM) entraîne-t-elle une vitesse de dissociation plus lente : la force de liaison est augmentée. Il s'agit de l'avidité.

De façon surprenante, il existe de rares espèces, comme les camélidés³⁹⁰, chez lesquelles la reconnaissance de l'Ag ne met en jeu que la chaîne lourde, les Ac étant totalement dépourvus de chaîne légère. Cette caractéristique structurale et fonctionnelle si particulière est à l'origine de nombreuses études³⁹¹.

3. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

3. 1. Des débuts de la sérothérapie au développement des anticorps monoclonaux

En 1882, Robert Koch rassembla Paul Ehrlich, Emil von Behring, Erich Wernicke, et Shibasaburo Kitasato dans l'idée de constituer le groupe de scientifiques le plus à même de contribuer efficacement au développement de l'immunothérapie. Ce sont les observations faites par E. von Behring qui ont débouché sur le concept qui a marqué la première ère de l'immunothérapie : la sérothérapie. Il mit en évidence que le sang de rats résistants à l'anthrax était capable de tuer la bactérie à l'origine de la maladie. Par la suite, lui et S. Kitasato, démontrèrent que le transfert du sérum d'un animal immunisé contre la toxine diphtérique conférait une protection contre la toxine à l'animal receveur du sérum³⁹². La reproductibilité de cette approche fut établie avec la toxine du tétanos. C'est la sérothérapie dirigée contre la diphtérie qui fut la première à être testée cliniquement en 1891 avant d'être développée à plus grande échelle, un an plus tard, par le fabricant de produits pharmaceutiques Farbwerke Hoechst, puis distribuée pour la première fois en 1894, dans le but de prévenir une épidémie de diphtérie. L'introduction de la thérapie par le sérum permit

une réduction importante de la mortalité, popularisant le terme de « *magic bullet* » pour la qualifier.

Le sérum utilisé à cette époque en sérothérapie provenant de sources non humaines, sans traitement préalable, un phénomène qualifié de « maladie sérique » était observable. Ces effets secondaires toxiques conduisirent à l'amélioration des méthodes de purification du sérum. Parallèlement, P. Ehrlich travailla à la standardisation de la sérothérapie, afin notamment de quantifier les effets thérapeutiques du sérum. Ce type de thérapie fut très largement utilisé, jusque dans les années 40, pour de nombreuses maladies bactériennes, dont la diphtérie, la méningite et la pneumonie. C'est dans les années 50 que la sérothérapie fut utilisée pour la première fois pour le traitement d'un patient atteint d'immunodéficience³⁹³.

Le début de la seconde ère de l'immunothérapie fut marqué, en 1975, par le développement par G. Köhler et C. Milstein d'une méthode permettant l'obtention d'AcM à partir d'hybridomes³⁹⁴. Ils montrèrent qu'il était possible de produire des lignées de cellules résultant de la fusion de cellules de myélome et de cellules productrices d'Ac. Les lignées hybrides découlant de cette fusion étaient ainsi capables, d'une part de croître indéfiniment (propriété du myélome), d'autre part de produire des Ac (propriété des cellules productrices d'Ac). Ces découvertes et avancées technologiques majeures de G. Köhler, C. Milstein furent récompensées en 1984 par un prix Nobel de physiologie ou médecine, partagé avec N.K. Jerne, inventeur de la théorie clonale³⁹⁵. Cependant, aucun brevet ne fut déposé sur cette méthode, laissant accessible la technologie des hybridomes à la recherche académique et pharmaceutique et permettant l'émergence de nouvelles thérapies.

3. 2. De l'anticorps murin à l'anticorps humain

L'humanisation des Ac thérapeutiques, c'est à dire le fait que leur séquence soit rendue la plus proche possible d'une séquence d'Ig humaine, est étroitement liée au développement de la biologie moléculaire.

Des Ac murins aux Ac entièrement humains, différentes étapes ont été franchies (**Figure 20**) :

- Ac de souris : toutes les chaînes de ces Ac sont d'origine murine. Ces Ac sont identifiés par la terminaison -omab (exception faite du muromonab).
- Ac chimérique : toutes les chaînes de ces Ac sont rendues chimériques par génie génétique. Les chaînes des Ac chimériques sont formées de régions constantes

d'origine humaine et de régions variables d'une autre espèce (généralement la souris), ou synthétiques. Ces Ac sont identifiés par la terminaison -ximab.

- Ac humanisé : toutes les chaînes de ces Ac sont modifiées par génie génétique. Une chaîne humanisée est une chaîne d'origine humaine, à l'exception des CDR qui sont d'une autre espèce (généralement la souris), ou synthétiques. Ces Ac sont identifiés par la terminaison -zumab

- Ac humain : toutes les chaînes de ces Ac, y compris la chaîne J le cas échéant, sont d'origine humaine. Ces Ac sont identifiés par la terminaison -umab.

(IMGT, <http://www.imgt.org/mAb-DB/index>)

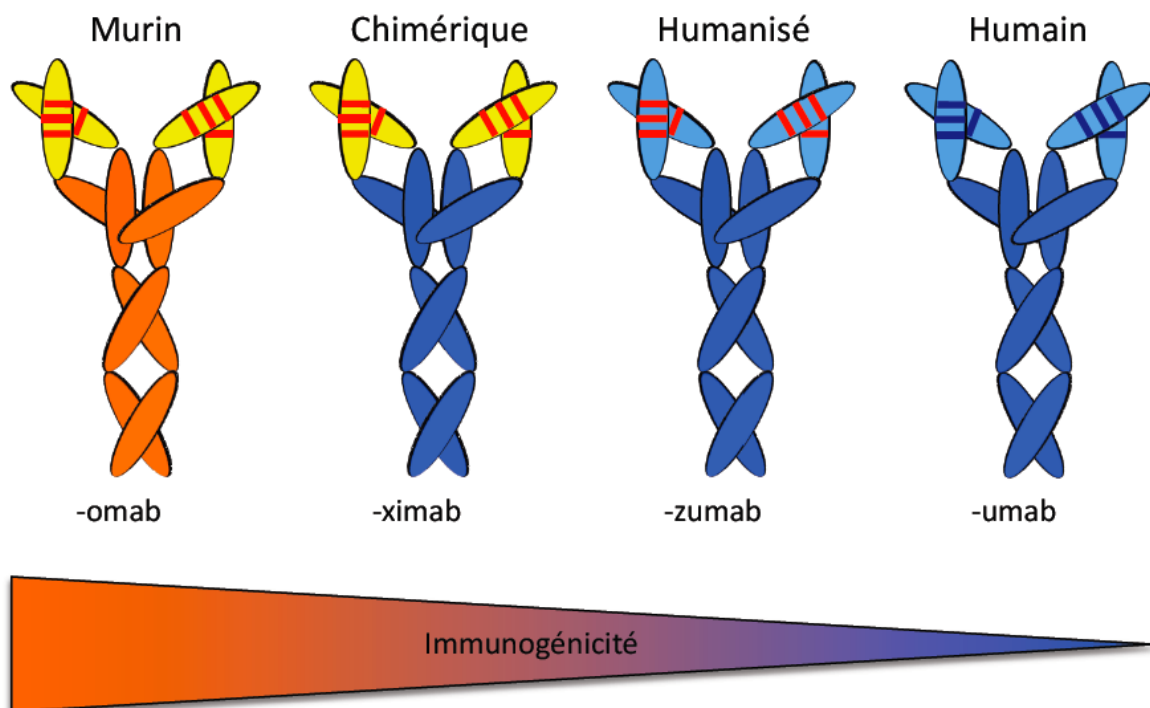


Figure 20. Différentes générations d'anticorps thérapeutiques. Aux Ac murins, chimériques, humanisés et humains sont respectivement appliqués les suffixes omab, ximab, zumab et umab. La diminution de la proportion de séquence murine (orange) en faveur de séquence humaine (bleue) dans la composition de l'Ac est généralement associée à une diminution de l'immunogénicité.

Le premier AcM, entièrement murin, fut généré en 1984 sous le nom d'orthoclone OKT3, également connu sous le nom de muromonab CD3³⁹⁶. Suite aux essais cliniques satisfaisants de cet AcM murin, de nombreux Ac dirigés contre des tumeurs solides et des maladies hématologiques furent développés et entrèrent en essai clinique à leur tour³⁹⁷. Malheureusement, le développement d'une réponse immunitaire contre ces Ac murins (*human anti-mouse antibody*, HAMA) limita leur potentiel clinique.

Contrairement aux AcM entièrement murins, les Ac chimériques, en raison de

leur Fc humain, sont capables de recruter des cellules effectrices humaines et d'activer efficacement la cascade du complément (voir C. 4.), *in vitro* et dans les essais pré-cliniques³⁹⁸. De plus, chez l'homme, l'utilisation des Ac chimériques réduit fortement la production d'HAMA. Cependant, les régions variables murines présentes dans l'Ac restent à l'origine d'une immunogénicité non négligeable des AcM chimériques utilisés en thérapie³⁹⁹. Des approches ont donc été développées, visant à diminuer l'immunogénicité de ces Ac : les épitopes immunogènes des domaines V murins de l'Ac peuvent être remplacés par des séquences en a.a. dépourvues d'effet délétère³⁹⁸.

Le développement de « l'humanisation » des Ac par G. Winter et ses collègues révolutionna le domaine des Ac thérapeutiques⁴⁰⁰. De même, les travaux menés par C. Queen et ses collaborateurs servirent de base à l'humanisation de nombreux AcM⁴⁰¹. Le principe de l'humanisation est le suivant : les six séquences des régions hypervariables d'un Ac murin (trois à partir du V_H et trois du V_L) sont greffées sur les régions charpentes de la région V d'un Ac humain⁴⁰². Finalement, à l'exception des CDR d'origine murine, tous les autres domaines de l'Ac exprimé sont d'origine humaine. Grâce à cette technologie, les réponses immunes générées contre ces Ac ont été très fortement diminuées, permettant des essais cliniques concluants, aboutissant à la mise sur le marché de nombreux AcM³⁸⁵. Dans de nombreux cas, il s'avère cependant nécessaire de remanier la séquence de l'Ac en en modifiant certains a.a., dans le but de stabiliser la construction et de restaurer la spécificité et l'affinité de l'Ac murin original.

Le marché actuel des AcM est largement dominé par des Ac recombinants issus d'une première génération qui a vu le jour grâce à une technologie développée dans les années 80, reposant sur le clonage d'hybridomes, l'ingénierie génétique et la production en système cellulaire hétérologue. Cependant, ces dernières années les AcM nés de nouvelles stratégies d'obtention, comme l'utilisation de souris transgéniques produisant des Ac intégralement humains ou la technique de phage display, sont de plus en plus représentés.

En effet, une étape supplémentaire de l'humanisation des Ac a été franchie lorsque des AcM humains fonctionnels ont été produits par le biais de souris « humanisées » transgéniques. Deux équipes (Cell Genesys et GenPharm) réussirent, de façon simultanée et indépendante, à façonner par génie génétique des souris invalidées pour leurs propres IgG, ayant perdu la capacité de produire des Ac murins, mais au contraire capables de produire des Ac humains, suite à l'introduction des

gènes humains correspondants^{403, 404}. En réponse à une immunisation, la souris transgénique génère des IgG intégralement humaines, dirigées contre l'Ag utilisé ; par la suite, les IgG peuvent être produites par la technique des hybridomes⁴⁰⁵. Douze ans après ces premières souris transgéniques, le premier AcM humain issu de cette technique, le Vectibix (panitumumab), qui cible l'EGFR, a été mis sur le marché (en 2006 pour la FDA et 2007 pour l'EMA). La majorité des Ac humains actuellement en essai clinique sont issus de cette technique.

Le premier AcM humain recombinant ayant obtenu une AMM, l'Humira (ou adalimumab, qui cible le TNF- α), a été développé à l'aide de la technique de *phage display*. Brièvement, cette approche *in vitro* repose sur l'utilisation d'importantes banques de gènes codants pour des Ac humains (>10⁹ clones), construites chez *E. coli*, fusionnés à une protéine de surface de phage. Les bactéries sont infectées par le phage filamenteux dont la descendance incorpore l'ADN et exprime la protéine de fusion, donc l'Ac humain, à sa surface. Une étape de liaison à l'Ag d'intérêt permet la sélection d'un phage parmi des milliards d'autres et ainsi d'isoler la séquence correspondant à l'Ac spécifique de l'Ag testé⁴⁰⁶. L'Ig est finalement synthétisée après transfert des gènes dans un système de production mammifère.

Les innovations rendant les AcM de mieux en mieux tolérés en clinique, combinées aux progrès techniques réalisés en matière de production à grande échelle, ont permis l'essor de ce biomédicament. Plus récemment, de nouvelles approches d'ingénierie moléculaire des Ac ont permis la production de molécules de plus petite taille, conservant la spécificité antigénique, mais aussi de fusionner des Ac à d'autres molécules de natures diverses ou encore de synthétiser des Ac présentant une double spécificité (voir C. 5.).

4. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux utilisés en oncologie

Les Ac thérapeutiques exercent leur action sur les cellules cancéreuses par le biais de différents mécanismes. De par leur liaison à la cellule cancéreuse, via le Fab, ils peuvent avoir un effet agoniste ou antagoniste sur un récepteur, induire l'apoptose, ou encore, lorsqu'ils sont couplés, permettre de délivrer un agent toxique ou une radiation jusqu'à sa cible. D'autre part, par l'intermédiaire du fragment Fc, les AcM ciblant des Ag tumoraux de surface ont le potentiel d'induire la mort cellulaire médiée par le système immunitaire : ils permettent le recrutement d'effecteurs

cellulaires et des molécules de la cascade du complément. Par ailleurs, les AcM peuvent également jouer un rôle dans la régulation du système immunitaire et cibler les cellules du stroma tumoral. Bien entendu, l'action d'un AcM est dépendante de sa cible (cellule cancéreuse ou du stroma). Par ailleurs, un même AcM peut exercer sa fonction anti-tumorale grâce à différents mécanismes.

La suppression de voies de signalisation (e.g. le cetuximab et le trastuzumab)^{407, 408}, la médiation de fonctions effectrices (e.g. le rituximab)⁴⁰⁹ et la modulation de la fonction des cellules T (cas plus particulier traité en C. 6.) (e.g. l'ipilimumab)⁴¹⁰ semblent être les approches thérapeutiques les plus efficaces.

Tous les AcM actuellement sur le marché appartenant à la classe des IgG, nous nous intéresserons ici exclusivement aux fonctions effectrices des IgG.

4. 1. Pharmacocinétique, pharmacodynamique et biodistribution

Le temps de résidence d'un Ac thérapeutique dans le corps humain est déterminé par un ensemble de processus : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de l'Ac (pharmacocinétique ou ADME). Chez l'homme, les IgG endogènes présentent des caractéristiques pharmacocinétiques prévisibles et linéaires : des petits volumes de distribution (3 à 9 L), une clairance faible (8 à 12 mL/h), des temps de demi-vie élevés (environ 21 jours). A l'inverse, les caractéristiques pharmacocinétiques des IgG thérapeutiques sont complexes, non linéaires et, de plus, variables d'un patient à l'autre et d'un Ac à l'autre⁴¹¹. Aussi, malgré le nombre croissant d'AcM thérapeutiques, les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces biomédicaments ne sont pas totalement connues. Les variations pharmacocinétiques interindividuelles peuvent s'expliquer par des différences d'expression de la cible tumorale d'un individu à l'autre, mais également par la génération de réponses immunitaires dirigées contre les AcM (e.g. HAMA). Quant à la pharmacodynamique de l'AcM, elle peut varier en fonction de la génétique du receveur et de son état clinique⁴¹².

Comme dit précédemment, chez l'homme, le temps de demi-vie des IgG est d'environ 21 jours, à l'exception des IgG3 pour lesquelles il est de 7 jours environ. De façon générale, il a été montré que le temps de demi-vie des AcM thérapeutiques augmentait avec le degré d'humanisation de l'Ac. En effet, un Ac entièrement murin présente une demi-vie d'environ 1,5 jours, un Ac chimérique de 10 jours, et de 12 jusqu'à 20 jours pour les Ac humanisés et humains⁴¹². La demi-vie courte des IgG

thérapeutiques murines a été attribuée à leur absence de liaison au FcRn (pour *neonatal Fc receptor*), entre autre responsable du prolongement de la demi-vie, ainsi qu'à la génération de HAMA par le receveur.

Les AcM sont éliminés de l'organisme selon un processus multifactoriel complexe (catabolisme, liaison au FcRn, immunogénicité, protéolyse, glycosylation...) ⁴¹².

Les AcM étant des molécules polaires de haut poids moléculaire, en comparaison à des petites molécules thérapeutiques, leur distribution dans les tissus est plus lente. De plus, dans de la tumeur, la distribution des AcM est gênée par les irrégularités de la vascularisation et la forte pression interstitielle ⁴¹³. Dans le cas d'une tumeur solide, la forte affinité d'un AcM pour un Ag tumoral peut s'avérer être un frein à la distribution de l'AcM. Ce phénomène est qualifié de « *binding site barrier* ». En effet, il a été montré, par des analyses de modélisation, qu'un AcM de haute affinité présentait une distribution tumorale hétérogène, la majorité des molécules restant bloquées à proximité de leur point d'extravasation dans la tumeur ; une affinité modérée permettrait une distribution optimale de l'AcM dans la tumeur ⁴¹⁴. Cette hypothèse a été entre autres soutenue par une étude montrant qu'à faible concentration la distribution de l'AcM se faisait dans les zones adjacentes aux vaisseaux et que des doses plus fortes étaient nécessaires à une distribution à l'ensemble de la tumeur ⁴¹⁵.

4. 2. Effets dépendants du fragment Fab

En se liant à des Ag, les AcM peuvent exercer leur action anti-tumorale indépendamment du système immunitaire du patient chez lequel ils sont administrés. En effet, les AcM sont capables d'antagoniser des voies de signalisation par divers mécanismes : par neutralisation d'un facteur de signalisation soluble (e.g. VEGF) ; en se liant et en bloquant la signalisation en aval de récepteurs membranaires ; par diminution du nombre de récepteurs à la surface (par « *stripping* » du récepteur ou par accélération de son internalisation et de sa dégradation) ⁴¹¹.

Les membres de la famille de l'EGFR, parmi lesquels EGFR et HER2, de par leur surexpression fréquente dans les tumeurs solides, sont la cible de nombreux AcM, utilisés seuls ou en association à des agents chimiques.

Le cetuximab, une IgG1 chimérique, figure parmi ces AcM : il cible spécifiquement l'EGFR. Cet AcM empêche la liaison du ligand à son récepteur ainsi que sa dimérisation, indispensable à l'initiation de la transduction d'un signal ³⁸⁵. Le

cetuximab exerce également un effet indirect : il permet le recrutement de cellules effectrices et l'activation de la cascade du complément⁴¹¹ (voir ADCC et CDC). Le panitumumab, une IgG2 humanisée, agit sur la même cible et selon les mêmes mécanismes que le cetuximab. Ces deux AcM sont utilisés dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Le cetuximab a montré de bons résultats en combinaison avec une chimiothérapie³⁸⁵.

Les AcM dirigés contre HER2 exercent principalement leur action en inhibant l'homo- et l'hétérodimérisation du récepteur. HER2 est surexprimé dans environ 30% des cancers du sein invasifs³⁸⁵. Le trastuzumab, un AcM humanisé de la classe des IgG1, est employé dans ce type de cancer. Cet AcM agit de façon directe, par inhibition de la dimérisation du récepteur, en induisant son internalisation et sa dégradation, mais aussi de façon indirecte, par activation du système immunitaire⁴⁰⁸. Utilisé en monothérapie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique surexprimant HER2 et n'ayant pas reçu de chimiothérapie préalable, il présente un taux de réponse de 35%⁴¹⁶. Des essais cliniques de phase III ont montré que l'addition du trastuzumab à une chimiothérapie entraînait une amélioration de la survie globale et sans progression de la maladie⁴¹⁷. Le pertuzumab, une IgG1 humanisée, est également dirigé contre HER2 sur lequel il exerce une gêne stérique, empêchant sa dimérisation⁴¹¹. En raison de leurs sites de liaisons différents, le pertuzumab et le trastuzumab ont été testés en thérapie combinatoire sur des xénogreffes de tumeurs surexprimant HER2 : *in vivo*, l'addition de ces deux AcM entraîne un effet synergique anti-tumoral⁴¹⁸. De plus, chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, l'addition du pertuzumab au trastuzumab et au docetaxel entraîne une augmentation de plus de 6 mois de la survie sans progression, ce qui représente un bénéfice important en comparaison à un traitement standard⁴¹⁹.

La co-expression de l'EGFR et de HER2 a été observée dans des carcinomes agressifs⁴²⁰. Une étude par *time-resolved fluorescence resonance energy transfer* a permis de mettre en évidence que l'administration conjointe du cetuximab et du trastuzumab entraînait une réduction de 72% des hétérodimères EGFR/HER2, se traduisant *in vivo* par un meilleur effet thérapeutique, en comparaison aux AcM seuls⁴²¹.

4. 3. Effets dépendants du fragment Fc

a. Les récepteurs du fragment Fc

Les récepteurs du fragment Fc (FcγR) peuvent transduire des signaux activateurs par l'intermédiaire de la phosphorylation de motifs ITAM (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) cytoplasmiques, ce qui aboutit à l'activation de fonctions cellulaires telles que l'ADCC et l'ADPh, décrites plus loin. Au contraire, la liaison du fragment Fc des AcM aux FcγR peut être à l'origine de signaux inhibiteurs des fonctions effectrices, via la phosphorylation de motifs ITIM (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) cytoplasmiques. Ainsi, certains FcγR ont des actions stimulatrices, comme les FcγRI et FcγRIIIA (respectivement connus sous les noms de CD64 et CD61), tandis que d'autres transduisent des signaux inhibiteurs, comme le FcγRIIB (également connu sous le nom de CD32)⁴²².

FcγRI est un récepteur à haute affinité qui est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les neutrophiles et les éosinophiles. FcγRIIIA est lui exprimé par les cellules NK (pour *natural killer*), les DC, les macrophages et les mastocytes. Il est notamment requis à l'action des cellules NK dépendante des Ac (ADCC). FcγRIIB (également appelé CD16B) est pour sa part uniquement exprimé à la surface des neutrophiles.

La liaison des IgG aux cellules tumorales permet leur reconnaissance par les cellules effectrices exprimant les récepteurs Fcγ (e.g. NK, neutrophiles, phagocytes mononucléaires et DC), ce qui promeut la destruction de la cellule tumorale par différents mécanismes. Il existe des variations d'affinité entre les différentes sous-classes d'IgG pour les FcγR, reflétées par leur capacité à recruter les cellules immunitaires effectrices. Les IgG1 et IgG3 humaines sont considérées comme les isotypes les plus actifs. Chez la souris ce sont les IgG2a et IgG2b⁴²³.

Suite à la lyse et/ou la phagocytose de la cellule tumorale, des peptides tumoraux peuvent être chargés sur des CMH (pour complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et présentés à la surface de cellules présentatrices de l'Ag (CPA), ce qui conduit à l'activation des cellules T CD4+. De plus, par un processus dit de présentation croisée, ces peptides peuvent être chargés à la surface de CMH de classe I, entraînant alors l'activation de cellules T CD8+³⁸⁵. On comprend donc que la rupture de la tolérance aux Ag tumoraux est un enjeu important de l'immunothérapie.

b. *Antibody-dependent phagocytosis*/ phagocytose dépendante de l'Ac (ADPh)

Les fonctions principales des macrophages sont de phagocyter et de digérer des débris cellulaires et des pathogènes. Bien qu'elles puissent être remplies de manière non spécifique, ces fonctions sont facilitées par l'opsonisation par les Ac, les macrophages exprimant des FcR à leur surface (**Figure 21**).

L'augmentation *in vitro* de l'ADPh médiée par des cellules effectrices humaines a été décrite pour différents Ag tumoraux, parmi lesquels le CEA (pour *Carcinoembryonic Antigen*), HER2, Ep-CAM (pour *epithelial cell adhesion molecule*), le CD20, le CD30 et le CD40⁴²⁴.

Des travaux visant à étudier l'efficacité d'un AcM spécifique d'une tumeur, reposant sur un modèle de métastases hépatiques chez le rat, ont permis de mettre en évidence que l'ADPh exercée par les macrophages du foie contribuait à l'élimination des cellules cancéreuses circulantes⁴²⁵. A des doses plus élevées d'AcM, un recrutement des monocytes a également été observé, soulignant le fait que l'efficacité thérapeutique de l'AcM s'exercerait par différents mécanismes d'action. Par ailleurs, la déplétion des macrophages s'était traduite dans ce modèle par une incapacité de l'AcM à prévenir la métastase, montrant l'importance de l'ADPh dans l'action anticancéreuse de l'AcM testé⁴²⁴.

Les IgG pouvant lier par leur fragment Fc des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des macrophages, des Ac bispécifiques (*bispécific Antibody*, bsAb) ont été produits pouvant d'une part lier un Ag tumoral et d'autre part cibler des FcR spécifiques, dans le but d'améliorer l'ADPh. C'est le cas d'un bsAb reconnaissant FcγRI présent à la membrane des macrophages et se liant par son deuxième paratope à HER2, surexprimé par des cellules de cancer du sein⁴²⁶ : cet Ac induit efficacement la phagocytose des cellules cancéreuses surexprimant HER2.

Comme expliqué dans le paragraphe C. 4. 3. a., l'ADPh par des CPA (e.g. DC) peut conduire à la présentation d'Ag tumoraux et ainsi engager la réponse des cellules T, éventuellement par des phénomènes de présentation croisée de l'Ag. Il semblerait que la présentation par le CMH II puisse être favorisée par une diminution de la liaison aux FcR inhibiteurs⁴²³, ce qui laisse penser que des Ac sélectifs d'un FcR donné puissent orienter la réponse immunitaire.

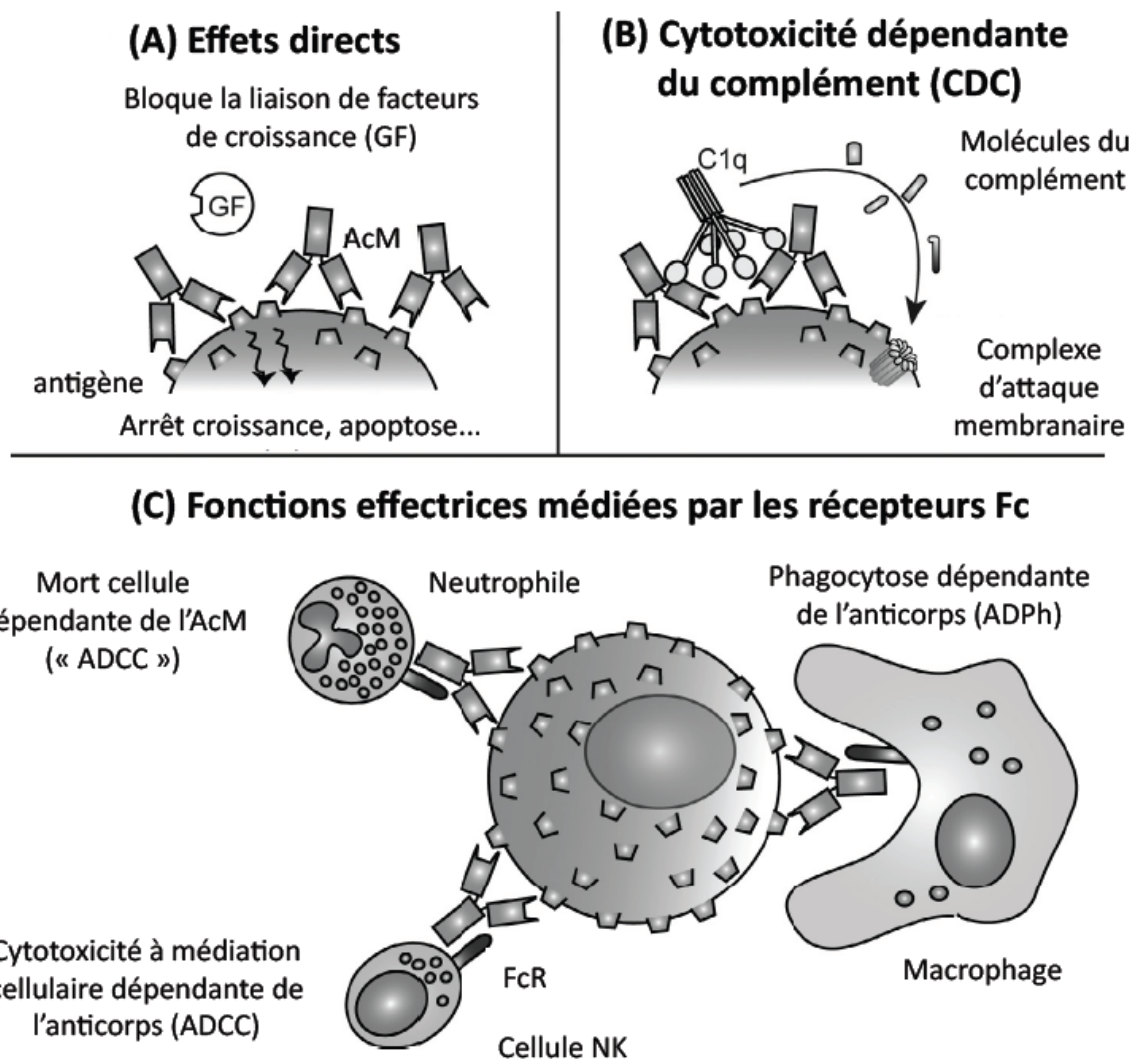


Figure 21. Mécanismes effecteurs des anticorps monoclonaux. (A) Les effets directs des anticorps monoclonaux (AcM) peuvent par exemple consister à bloquer la liaison d'un facteur de croissance ou induire l'apoptose. (B) Les AcM peuvent induire la CDC par liaison de C1q à leur domaine Fc, ce qui initie la cascade classique du complément. (C) Les AcM sont capables d'induire l'ADCC et l'ADPh, en recrutant différentes cellules effectrices. Le mécanisme d'action des neutrophiles est à ce jour mal élucidé. FcR : récepteur Fc. Proposé par Braster *et al.*, 2014⁴²⁴.

c. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity/cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'Ac (ADCC)*

L'ADCC met en jeu le recrutement de cellules effectrices du système immunitaire (**Figure 21**), telles que les cellules NK et les macrophages, via leurs récepteurs du fragment Fc des AcM. Les cellules cancéreuses ciblées par les AcM sont alors tuées par différents moyens, comme la libération de granzymes et de perforines⁴²³.

Des travaux préliminaires menés par Z. Steplewski ont permis de mettre en évidence qu'en présence d'IgG2a de souris dirigées contre des cellules tumorales, la capacité des macrophages, isolés de patients porteurs de tumeurs, à tuer des cellules

cancéreuses était augmentée *in vitro*⁴²⁷. Ceci a permis d'envisager l'utilisation d'AcM murins en immunothérapie anti-cancéreuse.

De nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de l'ADCC dans l'action anti-tumorale de certains AcM. En effet, des études *in vivo* ont établi l'importance de l'interaction entre le domaine Fc des IgG et leur récepteur, FcγR : chez des souris déficientes en FcγR, les activités anti-tumorales du trastuzumab et du rituximab sont réduites en comparaison à celles observées chez des souris WT⁴²⁸. D'autre part, G. Cartron et ses collaborateurs ont étudié l'effet du polymorphisme du gène codant pour FcγRIII sur l'action du rituximab, chez des patients atteints de lymphomes. L'administration de l'AcM aux malades présentant des variants de base affinité de FcγRIII a été moins bénéfique que pour ceux porteurs d'un récepteur de haute affinité, suggérant que l'action anti-cancéreuse du rituximab est pour une part importante due à l'interaction Fc-FcγR et donc à l'ADCC⁴²⁹. De plus, des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les malades, dont la rémission du cancer du sein HER2-positif avait été totale ou partielle en réponse au trastuzumab, avaient une meilleure capacité à induire l'ADCC avec l'AcM que les patients ne répondant pas à cette thérapie⁴³⁰.

Il a été montré que l'ADCC était étroitement liée à la composition en glycanes de l'IgG : une augmentation de l'activité ADCC a été observée après la réduction en fucose de l'Ac⁴³¹.

d. *Complement-dependent cytotoxicity*/cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

La CDC entraîne la mort des cellules cancéreuses reconnues par les AcM via l'activation de la voie classique du complément (**Figure 21**). La capacité des Ig à tuer les cellules en recrutant le complément est une fonction effectrice des Ac connue de longue date. Brièvement, après la fixation d'un Ac à sa cible à la surface d'une cellule, le domaine Fc de l'Ac peut lier C1q (première molécule de la cascade du complément, appartenant au complexe C1)⁴¹¹. Il s'en suit une activation de la voie du complément qui aboutit à la mort par lyse de la cellule ciblée. La fixation du complément à la surface d'une cellule nécessiterait une densité élevée d'Ac ; il a été estimé que la séparation entre les domaines Fc des Ac ne devait pas excéder 40 nm pour permettre le recrutement de C1q⁴¹¹. Des motifs de glycosylation complexes de l'Ac jouent un rôle important dans le recrutement des molécules du complément³⁸⁷.

Très tôt, des études ont pu démontrer *in vitro* l'implication du CDC comme mécanisme d'action des AcM⁴³². La plupart des AcM sur le marché qui exercent une action via l'ADCC sont également capables de recruter le complément. Au contraire, l'anti-CD52 alemtuzumab active le complément, mais son action anti-tumorale dans le cadre de la leucémie lymphoïde chronique n'est pas médiée par l'ADCC³⁸⁵.

L'action thérapeutique de divers AcM utilisés en clinique semble mettre en jeu le complément. C'est le cas du rituximab, qui cible le CD-20, dont il a été montré que l'efficacité *in vivo* était en partie due à l'activation du complément. En effet, chez des souris déficientes en C1q la protection anti-tumorale du rituximab a totalement été abolie⁴³³. De plus, dans un modèle de xénogreffe de lymphome humain à cellules B, la déplétion en complément a entraîné une diminution de l'activité thérapeutique de cet AcM⁴³⁴. Un polymorphisme dans le gène *C1qA* affecterait la réponse des patients au rituximab, montrant que l'AcM exercerait au moins une partie de son action via le complément⁴³⁵.

Dans certains types de tumeurs il a été mis en évidence une résistance à la CDC médiée par la surexpression membranaire de protéines de régulation du complément⁴³⁶.

Si de nombreuses études mettent en évidence la contribution de l'ADCC et du CDC à la lyse cellulaire dépendante de l'AcM, il est cependant difficile de quantifier la contribution de chacune de ces fonctions effectrices. Par exemple, dans un modèle murin de lymphome, la déplétion en complément induit une augmentation de l'activation des cellules NK et de l'ADCC, améliorant l'efficacité de l'AcM⁴³⁷.

5. Ingénierie des anticorps thérapeutiques en oncologie

Portés par leur succès, les Ac thérapeutiques ont fait l'objet de nombreux travaux d'ingénierie moléculaire. A cet enjeu conceptuel est venu s'ajouter un challenge en matière de génération de ces Ac (e.g. souris transgénique, phage/ribosome *display*), dans le but de les produire en quantité et avec une pureté satisfaisante. Afin qu'ils soient mieux tolérés par le système immunitaire chez l'homme, les AcM ont subi différentes étapes d'humanisation, qui font l'objet du paragraphe C. 3. 2. de cette introduction. Le recrutement du système immunitaire par le fragment Fc des AcM a été optimisé. Par ailleurs, des fragments d'Ac recombinants, présentant des caractéristiques pharmacocinétiques différentes, mais conservant les propriétés de

liaison à l'Ag, ont été générés. Des Ac conjugués (e.g. à des toxines) ou encore présentant une double spécificité ont également vu le jour. Tous ces Ac ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La partie variable de l'AcM, qui lui confère sa spécificité et son affinité pour un Ag donné, peut faire l'objet de modifications, visant à améliorer ses propriétés. Le fragment Fc, qui pour sa part est responsable de l'interaction de l'AcM avec les cellules et les molécules du système immunitaire, peut également être modifié par différentes approches, dans le but de renforcer les fonctions effectrices de l'AcM. Par mutagenèse dirigée, la liaison au FcR, et ainsi les fonctions effectrices médiées par les AcM, peut être modulée. Par exemple, le fragment Fc d'un Ac humanisé dirigé contre CD19 (Ag des cellules B) a été modifié, notamment par mutagenèse dirigée, dans le but d'augmenter la liaison au FcγRIIIA des cellules du système immunitaire : comparé à son IgG1 analogue, l'ADCC de cet AcM est augmentée *in vitro* ainsi que son activité anti-tumorale dans des modèles de souris xénogreffées⁴³⁸. L'ingénierie du fragment Fc permet également d'améliorer la liaison des Ig au FcRn, augmentant ainsi la demi-vie des AcM en empêchant la dégradation³⁸⁴. L'optimisation du fragment Fc peut aussi améliorer l'ADPh : des AcM plus affins pour le FcγRIIa permettent d'augmenter la phagocytose des cellules cancéreuses par les macrophages⁴³⁹. Différentes études réalisées sur l'IgG1 ont également permis d'analyser l'impact de certains a.a. du domaine CH₂ sur l'activation du complément, en procédant à des substitutions⁴⁴⁰ : des a.a. cruciaux au recrutement de C1q ont ainsi été identifiés. Une autre approche, consistant en une chimérisation isotypique, a permis d'augmenter l'activation du complément⁴⁴¹.

Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'une modification de l'état de glycosylation d'un l'AcM influe sur ses propriétés anti- ou pro-inflammatoires⁴³¹. En raison de leur mode de production, un grand nombre d'Ac thérapeutiques sont fortement fucosylés. Il a cependant été démontré que les Ac porteurs d'oligosaccharides défucosylés induisent mieux l'ADCC *in vitro* et ont une activité anti-tumorale accrue *in vivo*³⁸⁵. L'ADPh est également impactée par la glycosylation de l'Ac : en comparaison à l'AcM parental, l'incorporation d'un fragment Fc non glycosylé au trastuzumab (Ac anti-HER-2) entraîne une augmentation de 75% de l'ADPh des cellules cancéreuses HER-2-positives par les macrophages⁴⁴².

Si l'optimisation des Ac dans leur forme intégrale fait l'objet de nombreuses études, la production de fragments d'Ac est également un axe de recherche fortement développé (**Figure 22**). Dans un premier temps, le fragment Fc a été séparé par

protéolyse (par la papaine et la pepsine) des fragments Fab, et avec lui les effets qui lui sont associés (C. 4. 3.). Dans un second temps, les IgG ont été modifiées par génie génétique : des fragments d'Ac monovalents (e.g. Fab, scFv) et bivalents (e.g. F(ab')₂, diabody, minibody) ont ainsi été obtenus.

Dans la majorité des cas, l'interruption de la signalisation d'un récepteur ne requière pas l'intervention du domaine Fc de l'AcM, aussi cette action peut-elle être accomplie par la liaison de fragments Fab, et ce, sous différents « agencements » moléculaires. Il a en effet été montré que des fragments (Fab')₂ étaient capables d'induire une réduction dose-dépendante de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe, l'engagement du fragment Fc de l'Ac n'est donc pas requis ici⁴⁴³ ; l'action anti-tumorale est, dans ce cas, indépendante des mécanismes effecteurs impliquant le système immunitaire de l'animal.

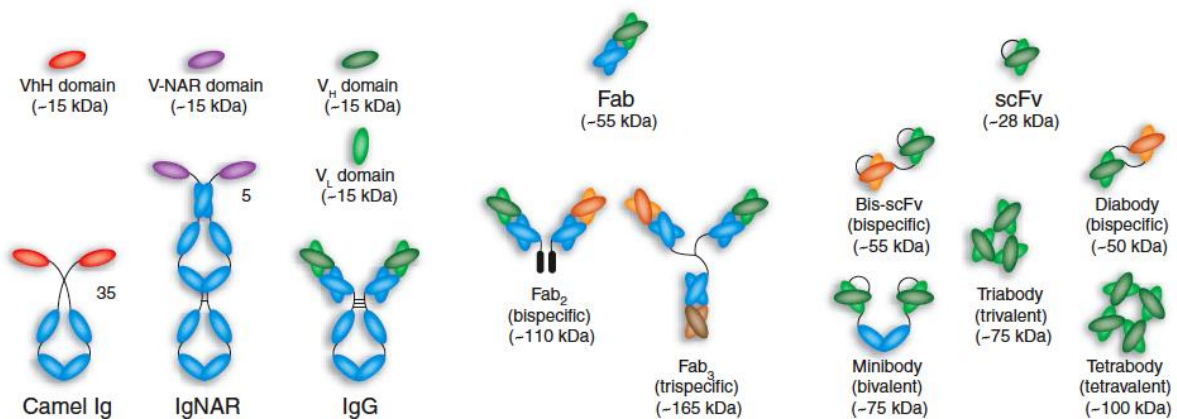


Figure 22. Représentation schématique de différents formats d'anticorps. Des constructions à spécificité unique ou multiple et de différentes valences peuvent être obtenues. IgNAR, V-NAR : requin. Proposé par Holliger et Hudson, 2005⁴⁴⁴.

Les fragments d'Ac recombinants présentent certains avantages face aux Ig complètes. Par exemple, ces fragments conservent la spécificité de liaison pour la cible de l'AcM intégral dont ils sont issus, tout en présentant une immunogénicité réduite. En fonction de la construction réalisée, le fragment Fc est, ou non, conservé. Dans certains cas les fonctions effectrices médiées par ce dernier ne sont non seulement pas nécessaires, mais, de plus, peuvent être dommageables. En effet, dans le cadre d'une application diagnostique, en imagerie, une demi-vie trop longue d'un Ac entraîne un mauvais contraste ; d'autre part, un recrutement et une activation inappropriés, via de fragment Fc, des cellules du système immunitaire peut conduire à une libération massive de cytokines et une toxicité associée.

La taille est un paramètre important de la pharmacocinétique et de la biodistribution de l'Ac ou du fragment d'Ac. En effet, une IgG entière, ayant pour cible tumorale un Ag de surface, pénètre lentement la tumeur solide, de façon hétérogène, et présente des taux sériques élevés, associés à des effets secondaires. Au contraire, un scFv présente une clairance rapide et une faible rétention au niveau de la tumeur, cette molécule étant monovalente. Une molécule de taille intermédiaire et multivalente (**Figure 22**) serait donc idéale pour cibler la tumeur puisqu'elle pénétrerait rapidement le tissu, y serait retenue tout en étant rapidement éliminée du sang⁴⁴⁴.

Quels que soient l'Ac complet ou la construction considérés, il est envisageable de les coupler à différentes substances (**Figure 23**), permettant un usage de ceux-ci à des fins diagnostiques ou de leur conférer une toxicité afin d'en avoir une utilisation thérapeutique.

Il existe trois catégories principales d'Ac conjugués à visée thérapeutique : les Ac conjugués à une molécule toxique (*antibody-drug conjugates*, ADC) ; les immunotoxines ; les radioimmunoconjugués (également utilisés en imagerie). Ces Ac conjugués permettent de délivrer une charge toxique de façon ciblée dans l'organisme (e.g. cellules cancéreuses), le but étant d'obtenir une action puissante localisée.

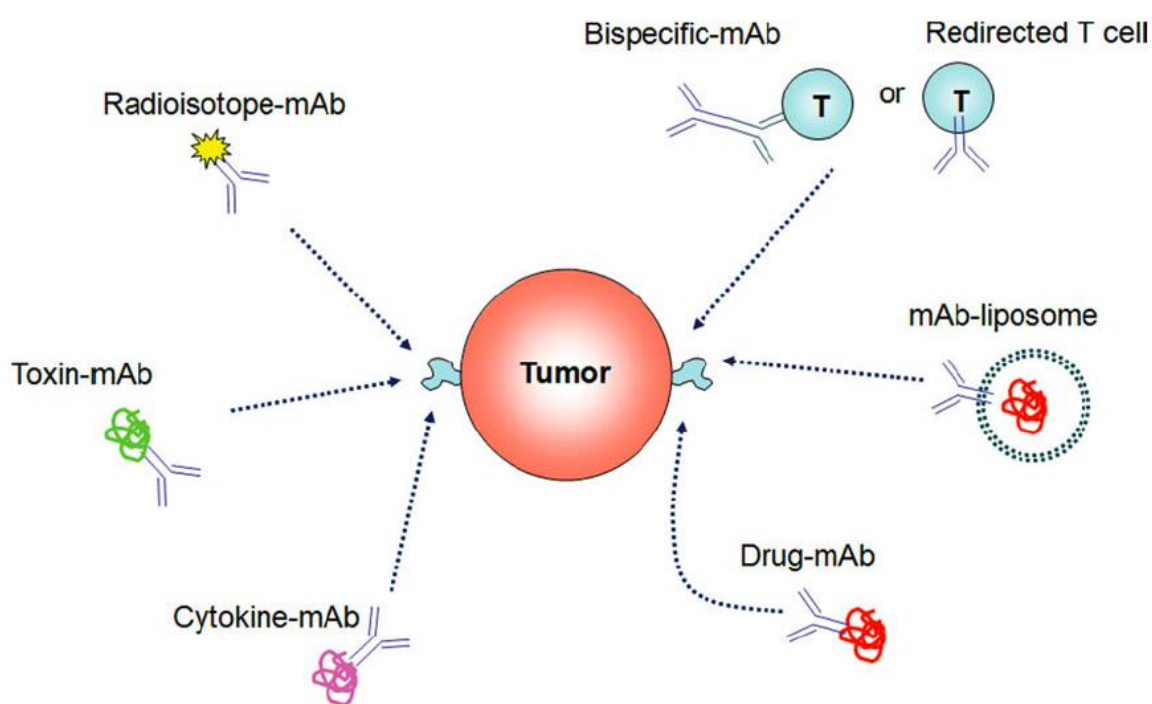


Figure 23. Anticorps couplés. Proposé par Kirkwood *et al.*, 2012³⁸¹.

Les ADC sont chargés avec des agents chimiothérapeutiques inappropriés à une utilisation clinique en raison de leur profil pharmacocinétique ou de leur trop grande toxicité. Les molécules toxiques le plus souvent employées en clinique sont les maytansinoïdes, les calicheamicines, et la monométhyle auristatine E (MMAE)⁴¹¹. Le brentuximab, qui a obtenu une AMM dans le traitement du lymphome Hodgkinien en 2011, fait partie de ces ADC couplés à la MMAE.

Les immunotoxines, quant à elles, exercent un effet anti-tumoral via de puissantes toxines issues de bactéries ou de plantes. Il peut s'agir d'Ig entières ou de fragments d'Ac. Le moxetumomab pasudotox, un anti-DC22 couplé à l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, est actuellement en essais cliniques dans différents types de leucémies.

Les radioimmunoconjugués présentent un intérêt thérapeutique mais également diagnostique en oncologie. Ils permettent de cibler des radioéléments au niveau de cellules cancéreuses. Le choix du radionucléide utilisé varie en fonction de l'application recherchée. Actuellement différents radioéléments couplés sont sur le marché : à des fins thérapeutiques des couplages à l'yttrium-90 (Y-90) et à l'iode-131 (I-131) sont réalisés, tandis que le technétium-99m (Tc-99m) et l'indium-111 (In-111) sont utilisés dans un but diagnostique.

Les caractéristiques de rétention et d'élimination de l'Ac, discutées plus haut, sont cruciales dans le cas des immunoconjugués. En effet les Ac couplés doivent permettre une destruction efficace des cellules tumorales par le biais de leur charge, sans pour autant léser les autres tissus de l'organisme. Un compromis doit donc être trouvé entre une rétention prolongée au niveau de la tumeur solide (e.g. Ig) et une pénétration efficace du tissu (e.g. scFv), le choix du format est donc tout aussi important que celui de la cible ou de la charge liée au l'Ac ou fragment d'Ac.

Les Ac utilisés en recherche et en thérapie peuvent être conjugués à de nombreuses autres molécules comme des antibiotiques, pour combattre des maladies infectieuses, ou des fluorophores, pour une détection en imagerie.

Le dernier exemple d'ingénierie des AcM abordé ici concerne les bsAb (dont un exemple a été traité dans la partie concernant l'ADPh). Dans la majorité des cas, ils se lient à deux épitopes différents appartenant à deux Ag distincts. Ils peuvent se présenter sous la forme d'IgG complète ou de fragments d'Ac (e.g. F(ab')₂, diabody)⁴⁴⁵. En tête des bsAb se trouvent ceux dont un des fragments variables reconnaît un FcγR et qui sont ainsi capables de recruter plus efficacement les cellules effectrices du système immunitaire, tandis que l'autre bras de l'Ac a pour cible un

TAA.

Le catumaxomab est le premier bsAb à avoir été approuvé par l'EMA en avril 2009 pour le traitement d'ascite maligne. Cet AcM est une Ig hybride composée d'une part d'une IgG2a de souris ciblant EpCAM sur les cellules cancéreuses, et d'autre part d'une IgG2b de rat spécifique du CD3 (chaîne du complexe TCR) des cellules T effectrices.

Les BiTE (pour *Bispecific T cell Engager*) sont un autre format innovant d'Ac à double spécificité. Il s'agit de molécules ciblant à la fois le CD3 et un marqueur antigénique permettant le ciblage spécifique des cellules cancéreuses. Les BiTE se composent de deux fragments Fv reliés entre eux par des linkers. Les cellules T recrutées par la molécule sont activées et engagent une réponse cytotoxique contre les cellules tumorales ciblées. Parmi les BiTE développés, le blinatumomab (MT103), qui est CD19/CD3 bispécifique, est celui dont les essais cliniques sont les plus avancés dans le traitement de la leucémie lymphoïde aiguë (phase III) (clinicaltrials.gov). Un autre BiTE, le solitomab (MT110), qui a pour cible EpCAM et le CD3, a montré une efficacité tumorale dans des modèles de xénogreffe⁴⁴⁶. Il est également en essai clinique (phase I) (clinicaltrials.gov).

Comme expliqué précédemment, le ciblage des cellules cancéreuses avec un radioimmunoconjugué est limité par la clairance de la molécule. Un Ac trivalent bispécifique actuellement en essai clinique, le TF2, est une des molécules offrant une réponse à cette problématique. Cette molécule originale présente deux sites de liaison au CEA, Ag surexprimé à la surface de cellules cancéreuses, et un site de liaison à un haptène⁴⁴⁷. Un pré-ciblage des cellules cancéreuses est réalisé avec le TF2 ; une fois le bsAb éliminé du sang, une construction radiomarquée comportant deux haptènes est administrée et rapidement fixée par deux Ac. Le pontage ainsi réalisé rend le complexe stable.

6. Anticorps monoclonaux thérapeutiques

6. 1. Les anticorps monoclonaux en oncologie

A l'heure actuelle, 23 AcM ont été acceptés pour un usage thérapeutique ou diagnostique en oncologie. Parmi ces AcM, 18 sont administrés « nus », 3 sont des radioimmunoconjugués (capromab, ibritumomab tiuxetan et tositumomab) et 2 sont

des ADC (brentuximab vedotin et trastuzumab emtansine). La **figure 24** récapitule l'ensemble de ces AcM actuellement à disposition dans le traitement du cancer.

En fonction du mécanisme d'action recherché, les caractéristiques pharmacodynamiques attendues de l'AcM diffèrent. En effet, s'il s'agit de rester lié à un récepteur de surface, dans le but d'activer/inhiber une voie de signalisation, ou de médier l'ADCC ou la CDC (avec un recours éventuel à l'optimisation du fragment Fc), le complexe AcM-Ag ne doit pas être rapidement internalisé par la cellule cancéreuse. Au contraire, un processus d'internalisation est recherché dans le cas d'une immunotoxine (élimination de la cellule cancéreuse par un mécanisme cytotoxique) ou pour un AcM dont l'action anti-cancéreuse repose sur une diminution du nombre de cibles présentes à la surface d'une cellule.

A l'inverse des maladies inflammatoires, pour lesquelles un nombre important de cibles ont déjà été validées, le domaine de l'oncologie nécessite encore à ce jour que de nouvelles cibles soient identifiées. Ceci est d'autant plus important que des résistances apparaissent chez les patients recevant des traitements couramment employés, associées à l'expression de nouvelles molécules cibles. Le choix d'une cible antigénique caractéristique d'un cancer, utilisable en thérapie, nécessite de prendre en considération son expression au sein de la tumeur (homogénéité ou hétérogénéité) ainsi que d'en connaître le profil d'expression dans les tissus sains. Il est de plus indispensable d'avoir une bonne compréhension du rôle biologique de l'Ag choisi dans la progression tumorale. Idéalement, un Ag doit : être exprimé par la majorité des cellules tumorales ; avoir une densité d'expression élevée à la surface de la cellule tumorale, en comparaison aux autres cellules de l'organisme ; avoir un rôle essentiel pour la cellule ; être peu libéré dans le milieu extra-cellulaire.

DCI	Nom commercial	Commercialisation	Classe	Conjugué	Cible	Application	Indication thérapeutique	AMM
Anticorps murins								
Edrecolomab	Panorex	Centocor/GSK	IgG2ak		EpCAM	thérapie	Cancer colorectal	1995
Capromab	Prostascint	EUSA Pharma	IgG1k	GYK-DTPA, In-111	PSMA	diagnostic	Cancer de la prostate	1996
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Biogen Idec/Schering/Spectrum Pharma.	IgG1k	tiuxetan, Y-90/ In-111	CD20	thérapie/diagnostic	LNH	2002
Tositumomab	Bexxar	Corixa/GSK	IgG2aλ	I-131	CD20	thérapie	LNH	2003
Catumaxomab	Removab	Fresenius/Neovii/TRION Pharma	IgG2ak/G2bλ (souris/rat)		CD3ε/EpCAM	thérapie	Ascite maligne	2009
Anticorps chimériques								
Rituximab	Rituxan/ Mabthera	Biogen Idec/Genentech/Roche/ CureTech	IgG1k		CD20	thérapie	NLH, LLC	1997
Cetuximab	Erbitux	BMS/Lilly/ImClone Systems/Merck & Co.	IgG1k		EGFR	thérapie	Cancer colorectal, métastatique	2004
Brentuximab vedotin	Adcetris	Seattle genetics/Takeda Pharmaceutical	IgG1k	MMAE	CD30	thérapie	LH, LAGC	2011
Anticorps humanisés								
Trastuzumab	Herceptin	Genentech/Roche	IgG1k		HER-2	thérapie	Cancers du sein, gastrique	1998
Alemtuzumab	Campath	Berlex/Genzyme/Millennium Pharma.	IgG1k		CD52	thérapie	LLC	2001
Bevacizumab	Avastin	Genentech/Roche	IgG1k		VEGF-A	thérapie	Cancers divers	2004
Nimotuzumab	Theracim	YM BioSciences	IgG1k		EGFR	thérapie	Cancer du pancréas	2008*
Mogamulizumab	Poteligeo	Kyowa Hakko Kirin	IgG1k		CCR4	thérapie	ATL	2012
Pertuzumab	Perjeta	Genentech/Roche	IgG1k		HER-2	thérapie	Cancer du sein	2012
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Genentech/Roche	IgG1k	DM1	HER-2	thérapie	Cancer du sein, métastatique	2013
Obinutuzumab	Gazyva/Gazyvaro	Biogen Idec/Genentech/Roche	IgG1k		CD20	thérapie	LLC	2013
Pembrolizumab	Keytruda	Merck & Co.	IgG4k		PD-1	thérapie	Mélanome, métastatique	2014
Anticorps humains								
Panitumumab	Vectibix	Amgen	IgG2k		EGFR	thérapie	Cancer colorectal, métastatique	2006
Ofatumumab	Arzerra	Genmab/GSK/Novartis	IgG1k		CD20	thérapie	LLC	2009
Ipilimumab	Yervoy	BMS/Medarex	IgG1k		CTLA-4	thérapie	Mélanome, métastatique	2011
Denosumab	Xgeva	Amgen	IgG2		RANKL	thérapie	Métastase osseuse	2013
Ramucirumab	Cyramza	Lilly/ImClone Systems	IgG1k		VEGF-R2	thérapie	Cancer gastrique, NSCLC	2014
Nivolumab	Opdivo	BMS/Ono Pharmaceutical	IgG4k		PD-1	thérapie	Mélanome	2014

Figure 24. Anticorps monoclonaux utilisés en oncologie. ATL : *adult T cell leukemia/lymphoma* ; BMS : Bristol-Myers Squibb ; DCI : dénomination commune internationale ; DM1 : mertansine ; GSK : GlaxoSmithKline ; GYK-DTPA (*chelator pendetide*) ; I-131 : Iodine-131 ; In-111 : Indium-111 ; LAGC : lymphome anaplasique à grandes cellules ; LH : lymphome hodgkinien ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LNH : lymphome non-hodgkinien ; MMAE : monométhyle auristatine E ; NSCLC : *non-small-cell lung cancer* ; Pharma. : *Pharmaceuticals* ; PSMA : *prostate specific membrane antigen* ; Y-90 : Yttrium-90 ; * : médicament orphelin.

Les AcM peuvent être classés en fonction de leur cible. Un premier groupe comprend les AcM dirigés contre des Ag exprimés par les cellules cancéreuses, de façon spécifique ou non (e.g. HER-2, CD20). Les mécanismes d'action de ces AcM peuvent être directs, par neutralisation de la cible, ou indirects, par recrutement des protéines et des cellules effectrices de l'hôte. Les AcM du second groupe ciblent des Ag du stroma tumoral. C'est le cas du bevacizumab et du ramucirumab, qui ciblent respectivement VEGF-A et VEGF-R2. En effet, la voie de signalisation du VEGFR est fortement associée à la croissance et à la dissémination tumorale : le VEGF, facteur de croissance pro-angiogénique exprimé par les cellules cancéreuses, se lie aux récepteurs présents à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire, stimulant de ce fait l'angiogenèse. La neutralisation de cette voie inhibe la formation de vaisseaux, empêchant ainsi l'alimentation de la tumeur. Les VEGF et leurs récepteurs constituent donc des cibles thérapeutiques anticancéreuses. Un dernier groupe d'AcM concerne ceux dont le but est de moduler la surveillance immunitaire de l'hôte contre la tumeur ; il s'agit d'Ac immunomodulateurs. Il a clairement été établi qu'une réponse immunitaire existait contre les tumeurs, chez les patients atteints de cancers³⁹⁸ ; elle est cependant inefficace en raison de divers mécanismes d'échappement au système immunitaire. L'utilisation d'Ac immunomodulateurs vise à lever l'inhibition exercée par les lymphocytes dits régulateurs, dans le but d'une meilleure réponse immune contre les cellules tumorales. Une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques anticancéreux a ainsi abouti au développement d'AcM inhibiteurs des points de contrôle immunitaires CTLA-4 (pour *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) et PD-1 (pour *programmed cell death 1*). Brièvement, la réponse immunitaire spécifique à un Ag tumoral résulte de l'interaction entre les cellules présentatrices de l'Ag (CPA), les L_T et les cellules cibles cancéreuses. Deux signaux sont nécessaires à la stimulation des cellules T : un premier signal provenant de la reconnaissance de l'Ag, présenté par le CMH à la surface des CPA, par le TCR, insuffisant à l'activation des cellules T ; un signal supplémentaire de co-stimulation, émanant de la liaison entre un membre de la famille des molécules B7 (CD80, CD86) et le CD28, permet l'activation des L_T. Consécutivement à cette activation, le CTLA-4 est transloqué au niveau de la synapse immunologique où il se lie avec une affinité plus forte aux mêmes molécules B7, stoppant le signal activateur initial induit par la liaison à CD28. Le premier AcM à avoir permis l'amélioration de l'immunité anti-tumorale par blocage du point de contrôle CTLA-4⁴⁴⁸, en augmentant l'activation et

l'expansion des cellules T effectrices, est l'ipilimumab. D'autres AcM immunomodulateurs ciblant le PD-1, ont depuis peu obtenu une AMM. Ces derniers s'opposent à la liaison du ligand PD-L1⁴⁴⁹, présent non seulement à la surface des CPA mais aussi des cellules cancéreuses, levant de ce fait l'inhibition de la réponse immunitaire. A l'opposé, des travaux sont également réalisés avec des Ac agonistes de molécules activatrices des cellules T³⁹⁷. En effet, parmi les AcM immunomodulateurs, certains fonctionnent comme des « superagonistes ». L'AcM TGN1412, superagoniste anti-CD28, est capable d'induire la prolifération des cellules T indépendamment de l'activation du TCR⁴⁵⁰. Cette activation du système immunitaire offre un mécanisme de lutte contre les cellules cancéreuses. Malheureusement, de par leur mécanisme d'action, ces d'AcM sont potentiellement à l'origine de grave effets secondaires, décrits plus loin.

Lors du développement d'un AcM, la sélection d'une cible antigénique peut se faire selon deux approches différentes. La première consiste à choisir une cible dite « validée », soit parce que des AcM ont déjà été générés contre cet Ag et qu'ils ont montré une action satisfaisante chez l'homme, soit parce que la littérature pointe, à travers des modèles *in vitro* et *in vivo*, l'importance de cette cible dans la carcinogenèse et/ou la progression tumorale. Il s'agit dans ce cas de développer des AcM de nouvelle génération, dirigés contre des épitopes différents de l'Ag. Cette approche a une grande probabilité de succès, comparée à l'approche fonctionnelle, plus ambitieuse et plus délicate, qui consiste en la sélection des AcM sur la base de leurs effets biologiques sur la tumeur (e.g. effet anti-prolifératif, apoptose). Dans un second temps, la cible antigénique est identifiée, notamment par protéomique et biologie cellulaire. Cette approche, qualifiée de pharmacologie inversée, permet d'identifier de nouvelles cibles antigéniques, peu ou pas étudiées, qui, en contre partie, doivent être minutieusement caractérisées.

Parmi les grands succès des AcM sur le marché figurent le rituximab (Rituxan®), le trastuzumab (Herceptin®) et le cetuximab (Erbix®) (**Figure 24**), qui sont respectivement dirigés contre le CD20 (*cluster* de différenciation des cellules du système immunitaire), HER-2 et l'EGFR (récepteurs de facteurs de croissance), cibles aujourd'hui incontestées en oncologie. Une seconde génération d'AcM, ciblant les mêmes Ag, mais des épitopes différents (variation de l'affinité), ont été modifiés afin de diminuer leur immunogénicité (humanisation) et ont été produits sous d'autres formats (Ac conjugués). Puis une troisième génération d'AcM a été produite, qui, souvent par optimisation du fragment Fc, a présenté des mécanismes d'action

différents³⁸⁴. Par exemple, l'obinutuzumab, sur le marché depuis novembre 2013, bien que dirigé contre la même cible, est moins immunogène que le rituximab, opère par mécanismes d'action différents et a une cytotoxicité augmentée par glyco-ingénierie⁴⁵¹. Ainsi, si le rituximab a été le premier AcM anti-CD20 sur le marché, ils sont à l'heure actuelle quatre à être dirigés contre la même cible antigénique.

6. 2. Limitations toxiques des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Parmi les avantages des AcM figure leur haute spécificité de reconnaissance pour une cible donnée, ce qui permet une action précise de ces biomédicaments. De plus, des administrations peu fréquentes sont possibles en raison de leur long temps de demi-vie. Bien que cette caractéristique limite les effets secondaires indésirables, voire toxiques, des AcM à l'échelle de l'organisme, ceux-ci ne sont pas inexistantes. Ils sont répartis en quatre catégories : le syndrome de libération de cytokines ; l'induction de pathologies auto-immunes ; la toxicité d'organes ; les infections opportunistes⁴⁵². Une dichotomie peut également être réalisée entre les effets dépendants de la cible (qui sont directement imputables à l'effet pharmacologique de l'AcM ou sont fonction de l'expression de la cible dans les tissus sains) et ceux qui en sont indépendants. En dépit des techniques d'ingénierie moléculaire qui ont permis de diminuer leur immunogénicité, en ayant recours à leur humanisation, leur structure intrinsèque peut également constituer une source d'effets nuisibles au bon déroulement du traitement. Dans le but d'illustrer le large spectre des effets secondaires causés par l'utilisation des AcM, quelques exemples seront donnés, concernant principalement les AcM indiqués en oncologie.

Parmi les AcM utilisés en oncologie, ceux dont le mécanisme d'action repose sur la modulation du système immunitaire ou de l'angiogenèse présentent une toxicité directement due à leur effet pharmacologique. C'est le cas de l'ipilimumab, anti-CTLA-4, qui, en raison de son mode d'action consistant à augmenter l'action des L_T effecteurs, est à l'origine de maladies auto-immunes, parmi lesquelles l'entérocologie auto-immune⁴⁵³, l'uvéite et le vitiligo. Le bévacizumab, un anti-VEGF, est un inhibiteur de l'angiogenèse, mécanisme central dans la progression tumorale puisqu'il permet la formation de vaisseaux sanguins alimentant la tumeur et intervient dans le processus métastatique. L'utilisation de cet AcM a, dans certains cas, été associée à de l'hypertension, des risques hémorragiques et plus rarement des perforations gastro-intestinales⁴⁵⁴.

Dans certains cas, les effets délétères associés à l'utilisation des AcM peuvent résulter de la reconnaissance de cibles exprimées par des tissus sains. Par exemple, les effets indésirables le plus souvent observés lors de l'administration des anti-EGFR, comme le cetuximab, sont des éruptions cutanées acnéiformes et des troubles unguéaux⁴⁵⁵ chez les patients traités. Le trastuzumab, AcM spécifique du récepteur HER-2, largement utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique HER-2-positif, augmente les risques d'insuffisance cardiaque congestive et de diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche, liés à l'expression du récepteur dans le muscle cardiaque⁴⁵⁶.

Certains éléments des AcM, reconnus comme étrangers par le système immunitaire du receveur, sont à l'origine de réponses immunitaires. Leurs manifestations cliniques varient de la réaction locale de la peau au niveau du point d'injection, à un syndrome de type grippal, jusqu'à un syndrome de réponse inflammatoire systémique, pouvant être fatal. Ces réactions vives de l'organisme peuvent être causées par différents mécanismes dont le syndrome de libération de cytokines (*cytokine release syndrome*, CRS), notamment induit lors de l'administration de rituximab⁴⁵⁷. Cette libération de cytokines peut s'avérer massive et soudaine, comme cela a été le cas avec le TGN1412⁴⁵⁸, entraînant une toxicité particulièrement sévère : il s'agit alors d'un choc cytokinique. En 2006, lors d'un premier essai clinique de phase I le TGN1412 a été administré à six volontaires sains par voie intraveineuse. 90 minutes après avoir reçu l'AcM, une réponse inflammatoire systémique a été observée chez les six hommes, se caractérisant par l'induction rapide de cytokines pro-inflammatoires (augmentation du taux sérique de TNF- α puis des concentrations circulantes d'IL-2, IL-6, IL-10 et IFN- γ) et s'accompagnant de maux de tête, myalgies, nausées, diarrhées, érythème, vasodilatation et hypotension. 12 à 16 heures après l'injection, l'état clinique des patients s'est davantage dégradé, avec l'apparition d'infiltrats pulmonaires, d'une insuffisance rénale et d'une coagulation intravasculaire disséminée. Au bout de 24 heures, une lymphopénie et une monocytopénie, obligèrent le transfert des patients en unité de soins intensifs⁴⁵⁸. En dépit d'études réalisées avec différents modèles animaux, les mécanismes précis du choc cytokinique chez l'homme ne sont pas totalement élucidés⁴⁵².

L'administration d'AcM est parfois à l'origine de maladies infectieuses. Par exemple, l'alemtuzumab, utilisé dans le cadre de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), a été mis en cause dans le développement de maladies opportunistes mais également de pneumopathies bactériennes et de septicémies⁴⁵⁹. L'administration

d'AcM provoquant une immunodéficience (e.g. anti-TNF α) est dans certains cas à l'origine d'infections lourdes comme la réactivation de tuberculoses latentes et l'apparition de leucoencéphalopathies multifocales progressives (maladie démyélinisante), dues à l'infection latente du système nerveux central par le JCV (pour *John Cunningham virus*)⁴⁶⁰.

L'utilisation d'AcM entièrement/partiellement murins pose un problème d'immunogénicité, causant non seulement des effets secondaires (e.g. chocs anaphylactiques, hypersensibilité, CRS), mais aussi une perte d'efficacité (formation de complexes immuns et élimination rapide)^{452, 460}. Le développement d'AcM chimériques, humanisés et totalement humains a considérablement contribué à la réduction de l'immunogénicité de ces molécules. La génération de HAMA contre l'idiotype reste malgré tout possible, l'immunogénicité n'étant pas réduite au pourcentage d'homologie avec un Ac humain, mais certains a.a. en des positions particulières y contribuant plus fortement⁴⁶⁰.

Différentes études cliniques ont permis de souligner un aspect important du développement des AcM : si des doses élevées d'AcM bloquant/antagoniste peuvent permettre d'induire une meilleure réponse anti-cancéreuse, à des concentrations plus faibles, des AcM agonistes, comme l'anti-CD137 urelumab (molécule de co-stimulation des cellules T) ou le TGN1412, présenteraient un effet anti-tumoral satisfaisant tout en diminuant les risques de toxicité associés à l'hyper-stimulation des cellules T³⁹⁷.

Malgré les effets secondaires parfois extrêmement délétères qui ont pu être observés lors de certains essais cliniques, le rapport bénéfice/risque inhérent à l'usage thérapeutique des AcM demeure très positif, en particulier parce qu'ils sont utilisés pour traiter des pathologies sévères, comme le cancer. Environ 20% des AcM développés sont acceptés, contre 5% pour les nouvelles molécules chimiques⁴⁶⁰, reflétant bien le fait que les AcM sont aujourd'hui des armes indispensables de l'arsenal thérapeutique. Au vu de désastres comme l'essai clinique du TGN1412, le développement de tests précliniques permettant de prédire un CRS, ou plus généralement d'identifier les effets toxiques des AcM avant qu'ils ne soient évalués chez l'homme, représente un enjeu majeur.

6. 3. Les récepteurs des endothélines : futures cibles des AcM en oncologie ?

L'ensemble des RCPG constitue une des familles protéiques les plus conséquentes du génome des mammifères⁴⁶¹. Plus de 800 RCPG humains ont été identifiés, dont une grande moitié sont des récepteurs olfactifs ou sensoriels. Ainsi, environ 370 RCPG, aux fonctions diverses, sont considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles⁴⁶². Les ligands naturels de ces récepteurs sont de natures et de tailles extrêmement variées, allant des ions aux hormones. En raison de leur implication dans diverses maladies (e.g. cancer, inflammation, maladies métaboliques), les RCPG sont des cibles thérapeutiques récurrentes : actuellement, 30% des médicaments disponibles sont dirigés contre eux. Malgré tout, relativement au nombre de récepteurs possiblement visés, un nombre très limité de molécules ont été obtenues contre eux, laissant un énorme potentiel en terme de développement de nouveaux traitements. De plus, depuis plusieurs années, la découverte de nouvelles molécules chimiques contre ces récepteurs est en nette perte de vitesse. Les techniques couramment employées dans la découverte de petites molécules chimiques conventionnelles n'étant malheureusement pas très efficaces pour générer des médicaments les contre les RCPG, ceci explique en partie pourquoi tout le potentiel pharmaceutique de cette famille de récepteurs n'a pas été exploité⁴⁶². Etant capables de cibler des épitopes variés, les AcM offrent de nouvelles perspectives dans ce domaine.

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de certains RCPG (e.g. CXCR4, CXCR2, ETR⁴⁶²) dans les processus cancéreux. Des AcM dirigés contre ces RCPG auraient une utilité en diagnostique et en thérapie anti-cancéreuse. Par des mécanismes d'action directs, ils pourraient : bloquer les voies de signalisation en aval de ces récepteurs qui promeuvent la prolifération, la métastase ou encore l'angiogenèse ; avoir des actions indirectes sur les cellules cancéreuses, médiées par le système immunitaire du patient ; agir par l'intermédiaire de molécules couplées. Pourtant, parmi les 23 AcM utilisés en oncologie, seul le mogamulizumab, un anti-CCR4 accepté au Japon en 2012 par le MHLW (*Japan Ministry of Health, Labour and Welfare*), est dirigé contre un RCPG. Cette observation peut se justifier par la difficulté technique à obtenir des AcM dirigés contre des RCPG.

Malgré le rôle incontestable des récepteurs de l'axe endothéline dans la progression tumorale, les AcM anti-ET_AR et anti-ET_BR sont absents des traitements anti-cancéreux. S'il existe de nombreux Ac commerciaux dirigés contre ET_AR et ET_BR,

leur reconnaissance des récepteurs dans leur contexte membranaire est cependant extrêmement limitée. Par ailleurs, les études s'intéressant à la production et à la caractérisation d'Ac dirigés contre les récepteurs des ET dans un contexte thérapeutique sont rares^{463, 464}. Récemment, J. Asundi et ses collaborateurs ont produit un AcM anti-ET_BR qui a été caractérisé grâce à des lignées de mélanomes⁴⁶⁴. Cet AcM est rapidement internalisé par les cellules de mélanomes ; en revanche, il n'exerce pas d'action antagoniste sur l'axe endothéline. Aussi les auteurs ont-ils couplé cet AcM à la MMEA. L'ADC obtenu a été testé sur des lignées de mélanomes et des xénogreffes chez la souris, sur lesquelles il a montré une bonne efficacité. La caractérisation de cet ADC a été récemment complétée par une nouvelle étude⁴⁶⁵ mettant en évidence une augmentation du niveau d'expression d'ET_BR en présence d'inhibiteurs de la voie MAPK, permettant d'améliorer l'activité anti-tumorale de l'ADC. Un premier essai clinique de phase I mené par Genentech est actuellement en cours pour cet AcM (*A Phase I, Open-Label Study of the Safety and Pharmacokinetics of Escalating Doses of DEDN6526A in Patients With Metastatic or Unresectable Melanoma* ; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01522664).

Un AcM anti-ET_BR exerçant une action antagoniste sur le récepteur a été produit et caractérisé dans notre laboratoire⁴⁶⁶, cependant il s'est montré incapable de reconnaître le récepteur exprimé à la surface des cellules cancéreuses, soulignant de ce fait l'existence possible d'une forme tumorale, jusqu'alors insoupçonnée, mise en exergue par la haute spécificité de reconnaissance de l'AcM. Un des autres AcM anti-ET_BR obtenu par le laboratoire, capable de reconnaître les cellules de mélanome, fait, en partie, l'objet de cette thèse.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Comme il a été développé dans l'introduction qui précède, il est aujourd'hui admis qu'ET_AR et ET_BR, qui ont dans un premier temps été identifiés dans le système vasculaire, sont, de façon générale, impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, et plus particulièrement, dans le cancer. En effet, l'axe endothéline intervient dans la progression tumorale, en jouant sur la physiologie des cellules cancéreuses et stromales.

C'est dans ce contexte qu'est née l'idée de faire des récepteurs humains des ET des cibles pour le développement d'AcM à visée thérapeutique et diagnostique en oncologie. Par ailleurs, ces Ac seraient des outils pour l'étude structurale et fonctionnelle des récepteurs des ET. J'ai bénéficié durant ma thèse de l'expertise en obtention et en caractérisation d'AcM du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (CEA/SPI) ainsi que de la connaissance de l'étude de la signalisation de l'axe endothéline du laboratoire de Signalisation Moléculaire et Cellulaire Utérine.

Mes travaux de thèse se sont articulés en deux temps.

D'une part, l'obtention d'AcM dirigés contre ET_AR. Ceci a consisté : dans un premier temps, à la mise en place et à la caractérisation d'outils cellulaires, c'est à dire des cellules surexprimant le récepteur ; puis, à la réalisation du protocole d'immunisation génique, à l'issue duquel ont été obtenues des souris productrices d'Ac dirigés contre ET_AR ; enfin, à l'élaboration et l'exécution d'un protocole de sélection des hybridomes sécréteurs d'Ac anti-ET_AR, obtenus consécutivement à une fusion cellulaire.

D'autre part, il a fallu caractériser ces AcM anti-ET_AR ainsi que des AcM anti-ET_BR, obtenus précédemment et dont l'étude n'avait été que très préliminaire. Les propriétés pharmacologiques de ces AcM ont été étudiées sur des lignées surexprimant les récepteurs des ET mais également sur des lignées cancéreuses. Je me suis plus particulièrement concentrée sur la caractérisation d'un AcM anti-ET_BR, le rendomab-B4 : retenu pour sa reconnaissance de lignées de mélanomes, son action sur certaines voies de signalisation du récepteur ainsi que ses effets cellulaires ont été étudiés dans un contexte de cellule cancéreuse.

PARTIE RESULTATS ET_AR

A. Implication de l'axe ET-1/ET_AR dans la carcinogenèse, exemple des cancers de l'ovaire et de la prostate

Comme cela a largement été décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, la surexpression et l'implication de l'axe ET-1/ET_AR dans la progression tumorale ont été mises en évidence dans de nombreux cancers²⁵³.

Afin de mieux illustrer la pertinence de l'axe endothéline comme cible thérapeutique anti-cancéreuse, j'ai fait ici le choix de prendre deux exemples de cancers dans lesquels l'axe ET1/ET_AR remplit un rôle crucial : le cancer de l'ovaire et celui de la prostate.

1. Axe ET-1/ET_AR et progression tumorale

L'activation d'ET_AR par la liaison de l'ET-1 conduit à la mise en place de différents processus cellulaires qui favorisent la croissance et la progression tumorale (**Figure 25**). En effet, en aval du récepteur activé, les diverses voies de signalisation mises en jeu conduisent, par exemple, à la prolifération cellulaire, à l'échappement des cellules à l'apoptose, à la formation de nouveau vaisseaux, à la migration et à la dissémination métastatique. De plus, dans certaines tumeurs, dont celles d'origine prostatique, l'ET-1 stimule la prolifération des ostéoblastes et au contraire diminue la résorption osseuse due aux ostéoclastes, participant ainsi à l'apparition de métastases osseuse. L'activation du récepteur ET_AR est également une composante importante de la perception de la douleur chez les malades. De plus, les ET interviennent dans la modulation de la migration, de la différenciation et de l'activation les cellules immunitaires infiltrant la tumeur²⁵³.

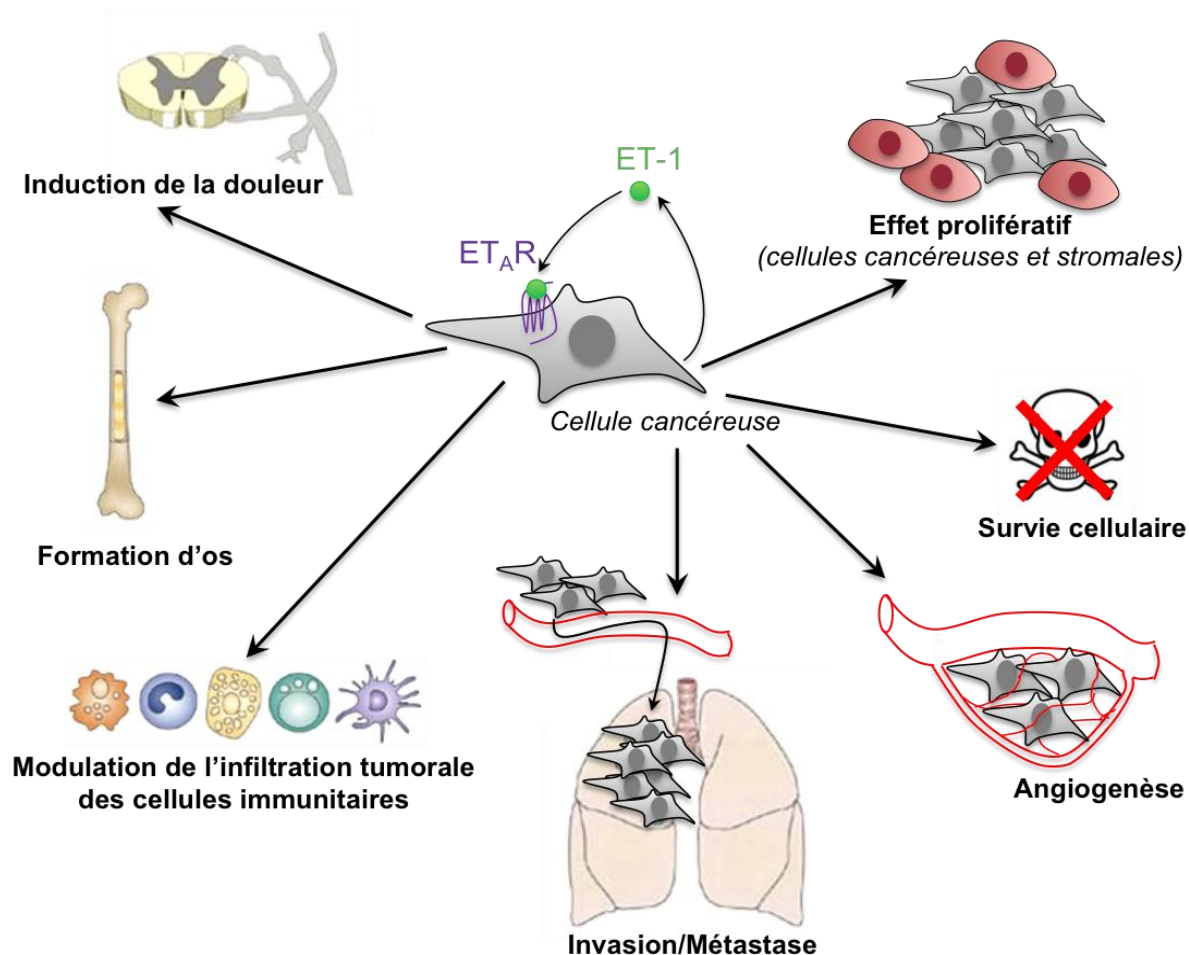


Figure 25. Implication de l'axe ET-1/ET_AR dans la progression tumorale. La signalisation autocrine et paracrine d'ET_AR induite par ET-1, au sein de la tumeur et dans le stroma tumoral, conduit au développement de nombreux cancers. D'après Bagnato et Rosano, 2008²⁵³.

2. Cancers de l'ovaire et de la prostate : deux enjeux de santé publique

Les incidences et les taux de mortalité des cancers de l'ovaire et de la prostate suffisent à se convaincre que ces maladies représentent toutes deux des problèmes de santé publique majeurs. En 2012, à l'échelle mondiale, un cancer de l'ovaire a été diagnostiqué chez près de 240 000 femmes et plus de 150 000 décès consécutifs à la maladie ont été comptabilisés (GLOBACAN 2012, Organisation Mondiale de la Santé), soit une survie à 5 ans d'environ 35%⁴⁶⁷. Cette même année, 1 111 000 nouveaux cas de cancer de la prostate ont été diagnostiqués à travers le monde et plus de 300 000 hommes sont morts de cette maladie (GLOBACAN 2012, Organisation Mondiale de la Santé). Ces chiffres révèlent l'urgence de la situation quant au développement de nouvelles thérapies.

3. Axe ET-1/ET_AR et cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire, hautement métastatique, est caractérisé par une large dissémination péritonéale et des ascites⁴⁶⁸.

Par différentes approches (gain/perte de fonction et antagonistes du récepteur), le rôle clé de l'axe autocrine ET-1/ET_AR a été confirmé dans le développement et la progression du carcinome ovarien^{278, 280}. Il existe une surexpression d'ET-1 dans les tumeurs primaires et métastatique de carcinome ovarien, en comparaison à des tissus ovariens sains^{253, 268}. Dans ces tumeurs, l'effet du peptide est médié par ET_AR, dont la surexpression a également été mise en évidence²⁵³. En effet, dans plus de 85% de ces cancers, des niveaux élevés d'ET-1 sont relevés dans les ascites des patientes, associés à une surexpression et une suractivation d'ET_AR^{280, 302}. Il semble exister une corrélation entre cette surexpression de l'axe ET-1/ET_AR et l'avancement en grade de la tumeur considérée²⁸⁰. L'analyse du profil d'expression génique d'EDNA a abondé dans ce sens, montrant que le gène était associé à la métastase. Par ailleurs, le niveau d'expression d'EDNA est augmenté dans les échantillons prélevés après une chimiothérapie, en comparaison aux échantillons de tumeurs primaires non traitées²⁵³, suggérant que l'axe endothéline participe à la résistance du cancer.

4. Axe ET-1/ET_AR et cancer de la prostate

Il a été largement démontré que l'axe endothéline était impliqué dans la physiopathologie du cancer de la prostate^{262, 267, 322, 469}.

En conditions physiologiques, ET-1 est produite par les cellules endothéliales de la prostate et des concentrations élevées du peptide vasoactif sont retrouvées dans le liquide séminal⁴⁶⁹. L'expression d'ET-1 a été mise en évidence dans la grande majorité des cancers de la prostate, et de façon plus intéressante, les concentrations plasmatiques chez les patients présentant un cancer métastatique sont plus élevées que chez des individus sains ou dont le cancer est localisé⁴⁶⁹.

L'expression des récepteurs des ET se trouve quant à elle également altérée en comparaison à un tissu sain^{267, 470}. L'expression d'ET_AR est augmentée dans les tumeurs primaires et métastatiques de stade et de grade avancés. Au contraire, l'expression prédominante d'ET_BR dans les cellules épithéliales prostatiques se

trouve réduite dans les cellules cancéreuses : cette réduction est en partie imputable à des mécanismes d'hyperméthylation du promoteur du gène²⁶².

Dans le cas d'une prostate cancéreuse, les voies classiques d'élimination d'ET-1, via la liaison à ET_BR²⁶⁷ et également via la NEP⁴⁷¹, semblent diminuées. Ceci participerait également à l'augmentation locale des concentrations d'ET-1.

Alors que l'activation d'ET_BR participe à l'élimination d'ET-1 et stimule l'apoptose, l'activation de l'axe ET-1/ET_AR joue un rôle crucial dans la progression du cancer de la prostate, impactant la prolifération, l'échappement à l'apoptose, la formation d'os et altérant la qualité de vie des patients en détériorant l'équilibre dans la modulation de la douleur²⁵³. On notera ici que les réponses à la liaison des ET restent dépendantes du type cellulaire. Dans le cancer de la prostate, l'augmentation de l'expression de l'axe ET-1/ET_AR donne donc, sans ambiguïté, un avantage en terme de progression de la maladie.

5. La thérapie : les traitements actuels, leurs limites et les nouvelles cibles moléculaires

Bien que le cancer de l'ovaire réponde bien à la chimiothérapie, une fois qu'il devient résistant à celle-ci, les traitements à disposition du corps médical sont relativement peu efficace. Selon l'Institut National du Cancer (INCa), en fonction du type histologique, du stade et du grade du cancer de l'ovaire, les patientes subissent une chirurgie et/ou une chimiothérapie, associant généralement un sel de platine et un taxane (souvent le carboplatine et le paclitaxel, respectivement) (©Les traitements des cancers de l'ovaire, collection Guides patients Cancer info, INCa, novembre 2010). En cas de récurrence, et elles sont nombreuses, le cancer devient résistant à la chimiothérapie, nécessitant le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques reposant sur la connaissance des mécanismes moléculaires qui existent en amont de la progression tumorale. Parmi eux, des inhibiteurs de l'enzyme nucléaire PARP (pour poly(ADP-ribose) polymérase), qui intervient dans la réparation de l'ADN, ou le bevacizumab, un anti-VEGFA, déjà sur le marché pour le traitement d'autres cancers, dont la fonction est l'inhibition de l'angiogenèse. Rappelons ici qu'il existe une transactivation du récepteur du VEGF via l'axe endothéline, ce qui souligne la pertinence du choix d'ET_AR comme cible thérapeutique.

Le cancer de la prostate présente une prolifération cellulaire lente couplée à une diminution de la mort cellulaire⁴⁷², ce qui en fait une maladie relativement résistante aux agents chimiothérapeutiques. Si la privation en androgènes est dans un premier temps bénéfique, la maladie peut de nouveau progresser 1 à 2 ans plus tard : on parle alors de cancer de la prostate résistant à la castration. Cet aspect du cancer de la prostate a favorisé le développement, voire l'approbation, de nouveaux traitements venant au renfort des thérapies classiques (chirurgie, radiothérapie, curiethérapie, hormonothérapie et chimiothérapie, employant souvent le docetaxel) (©Les traitements du cancer de la prostate, collection Guides patients Cancer info, INCa, novembre 2010). La FDA a par exemple accepté le denosumab, un AcM humain, dans la prévention des complications squelettiques chez les patients atteints de métastase osseuse. L'implication de l'axe endothéline dans ce type de métastase confirme ici encore qu'ET_AR est une cible de choix en thérapie anti-cancéreuse. Une partie de l'introduction a été dédiée aux essais cliniques portant sur l'efficacité des antagonistes chimiques des récepteurs des ET dans le traitement de certains cancers, notamment des antagonistes d'ET_AR dans le cancer de la prostate résistant à la castration ; les résultats décevants de ces essais n'ont pu conduire à des autorisations de mise sur le marché.

D'une part, l'implication de l'activation du récepteur ET_A dans l'agressivité des cancers de l'ovaire et de la prostate, et d'autre part, les moyens thérapeutiques actuels limités quant au traitement de ces cancers, justifient le ciblage d'ET_AR pour ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Les antagonistes chimiques d'ET_AR ayant échoué dans les essais cliniques menés dans le cadre du cancer de la prostate, il est nécessaire de développer d'autres types de molécules contre ET_AR. Des AcM dirigés contre ce RCPG auraient notamment les avantages de pouvoir entrer en compétition avec le ligand naturel du récepteur, de pouvoir exercer un effet antagoniste sur les voies de signalisations activées ou encore de pouvoir être couplés, permettant de ce fait une utilisation en diagnostic, en utilisant le récepteur comme un marqueur des cellules tumorales, ou en thérapie.

B. Stratégie d'obtention des anticorps anti-ET_AR et protocoles

La partie qui suit a pour but de présenter les travaux réalisés durant ma thèse concernant l'obtention d'AcM dirigés contre ET_AR. Il s'agit ici, dans un premier temps, de décrire la stratégie d'obtention des Ac polyclonaux et le mode de criblage des hybridomes producteurs d'Ac spécifiques d'ET_AR, puis, dans un second temps, d'exposer et de discuter, à travers quelques résultats, la caractérisation préliminaire des AcM anti-ET_AR.

1. Production des anticorps polyclonaux anti-ET_AR

1. 1. Mise en place et caractérisation des outils cellulaires

a. Cellules surexprimant le récepteur ET_AR

L'objet de mon projet de thèse est l'obtention et la caractérisation d'AcM dirigés contre ET_AR, capables de reconnaître ce récepteur dans son contexte membranaire, notamment dans le cas où il est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses. Les étapes de développement de ces Ac, c'est à dire l'immunisation des souris et le criblage des hybridomes, nécessitent d'avoir à disposition des lignées surexprimant, ou non, le récepteur et ce de façon stable ou transitoire.

Une lignée de cellules CHO (pour *chinese hamster ovary*) surexprimant le récepteur A humain des ET (appelées CHO-ET_AR) a été fournie au laboratoire par le Dr. M. Iglarz (Actelion). En raison des difficultés techniques rencontrées pour développer des cellules HEK-293 (pour *human embryonic kidney*) surexprimant de façon stable le récepteur, j'ai fait le choix de l'exprimer de façon transitoire dans ces cellules et qu'elles ne soient utilisées que lors du protocole d'immunisation. Le criblage des hybridomes, qui nécessite un lourd travail de culture cellulaire, et la caractérisation des Ac, qui requière l'utilisation de lignées chez lesquelles l'expression du récepteur est normalisée et sa signalisation est correctement décrite, pour une reproductibilité satisfaisante des résultats, ont été réalisés à l'aide des CHO-ET_AR.

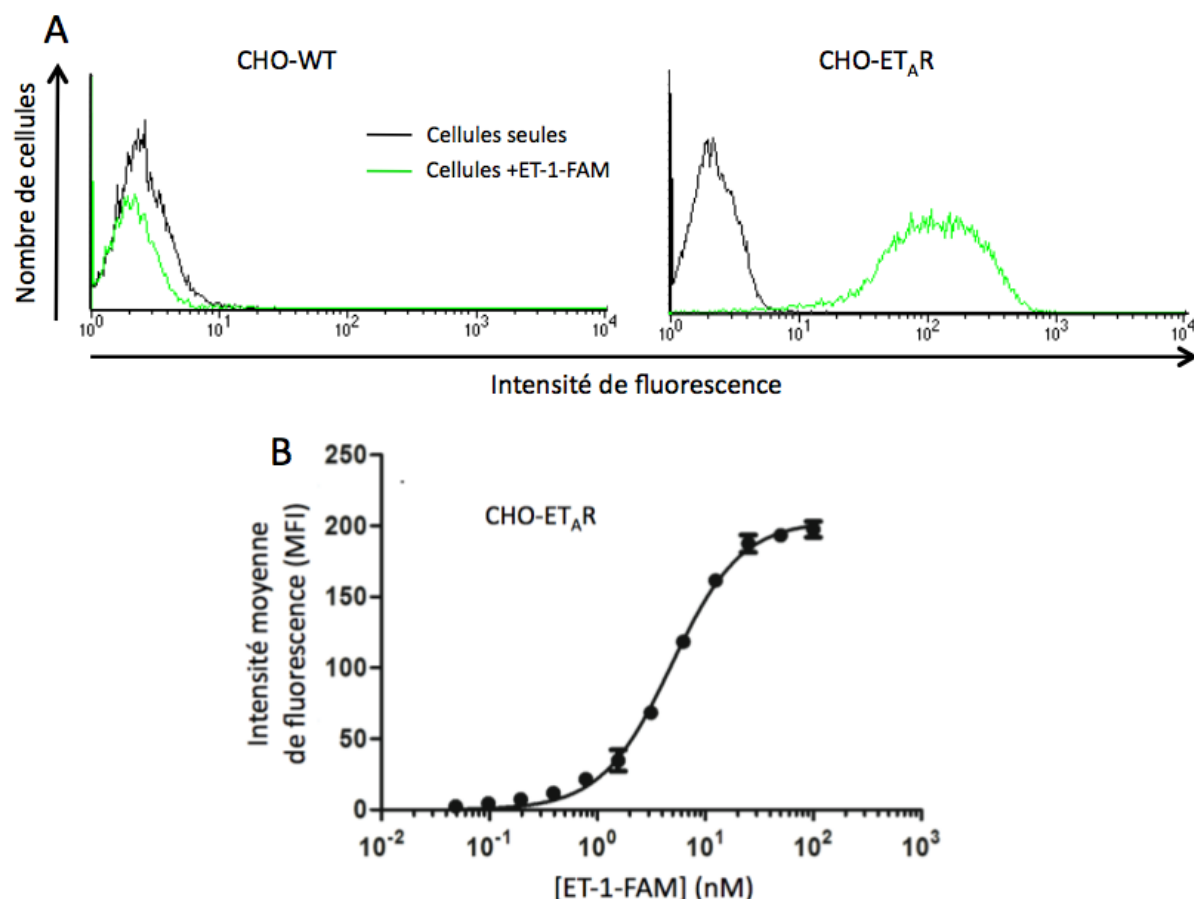


Figure 26. Liaison spécifique et saturation à l'équilibre de l'ET1-FAM sur ET_AR exprimé à la surface de cellules CHO. (A) Les cellules des lignées CHO-WT et CHO-ET_AR ont été incubées dans du tampon seul (courbes noires) ou en présence d'ET-1-FAM (courbes vertes). L'intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. (B) Les cellules CHO-ET_AR ont été incubées en présence de concentrations croissantes d'ET-1-FAM pendant 24 h, à 4°C, et les intensités moyennes de fluorescence (MFI) correspondantes ont été mesurées par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, il s'agit de contrôler l'expression d'ET_AR à la surface des cellules CHO exprimant stablement le récepteur. Comme il a été mentionné dans la partie introductive qui précède, ET_AR présente une affinité plus grande pour l'ET-1 que pour les autres ET⁵⁶. L'expression d'ET_AR humain à la surface des CHO-ET_AR a donc été contrôlée par des expériences de cytométrie en flux en mettant les cellules en présence d'ET-1 marquée avec de la fluorescéine (ET-1-FAM). Les expériences réalisées ont toutes été faites sur cellules vivantes (non fixées), dans le but de préserver au mieux l'intégrité des protéines membranaires et donc la conformation native du récepteur.

Un contrôle systématique de l'expression du récepteur a été effectué avant chaque utilisation des cellules, notamment lors des diverses étapes de criblage consécutives à la fusion cellulaire. Après avoir été mises en suspension, les cellules

ont été incubées dans du tampon de saturation en absence ou en présence de 100 nM d'ET-1-FAM, pendant 45 min, à 4°C, dans l'obscurité. Les résultats de cytométrie en flux présentés dans la **figure 26A** montrent qu'aucun signal n'est détecté à la surface des CHO non transfectées (CHO-WT, pour CHO-*wild type*) incubées avec l'ET-1-FAM, alors que les CHO-ET_AR incubées avec le ligand fluorescent présentent un fort marquage membranaire. Ces résultats attestent de la présence du récepteur à la surface des cellules, dans sa conformation native.

Des expériences de saturation à l'équilibre sont venues compléter cette étude de l'expression du récepteur par les CHO-ET_AR. Pour ce faire, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes en ET-1-FAM, pendant 24h, à 4°C, dans l'obscurité. La courbe présentée dans la **figure 26B** est représentative des expériences de la liaison à l'équilibre de d'ET1-FAM à la surface des CHO-ET_AR ; elle correspond à la MFI en fonction des concentrations de ligand marqué. La liaison de l'ET marquée à la membrane des CHO surexprimant de façon stable ET_AR est saturable, ce qui atteste de la spécificité de cette liaison. L'ET-1-FAM lie les CHO-ET_AR avec une affinité inférieure à 10 nM, la liaison maximale étant atteinte vers 50 nM.

L'obtention de cellules HEK-293-T exprimant de façon transitoire ET_AR a nécessité un important travail de mise au point. Les HEK-293-T ont été transfectées avec différentes concentrations d'ADN plasmidique codant pour les récepteurs des ET. Leur expression à la surface des cellules a ensuite été contrôlée en incubant les cellules pendant 45 min, à 4°C, en présence d'ET-1-FAM. Comme le montre la **figure 27**, qui résume les résultats de cytométrie en flux, à 2 µg de plasmide codant pour ET_AR, le marquage dû à la liaison d'ET-1-FAM est presque inexistant. Pourtant, dans les mêmes conditions, le décalage de fluorescence obtenu pour les cellules transfectées avec l'ADNc d'ET_BR est conséquent. Ceci reflète la présence d'un plus grand nombre d'ET_BR capables de lier l'ET marquée, c'est à dire exprimés à la membrane dans leur conformation native, que d'ET_AR. Pour tenter d'améliorer l'expression d'ET_AR, les cellules ont été transfectées avec des quantités croissantes de plasmide. Comme le montrent les résultats, l'augmentation de la quantité de plasmide codant pour ET_AR transfectée permet de palier la différence d'expression, suggérant qu'il s'agirait davantage d'une difficulté d'expression d'ET_AR que d'une conformation altérée de celui-ci. Lors du protocole d'immunisation, détaillé par la suite, les rappels cellulaires ont été réalisés après transfection de 6 µg d'ADNc plasmidique codant pour ET_AR.

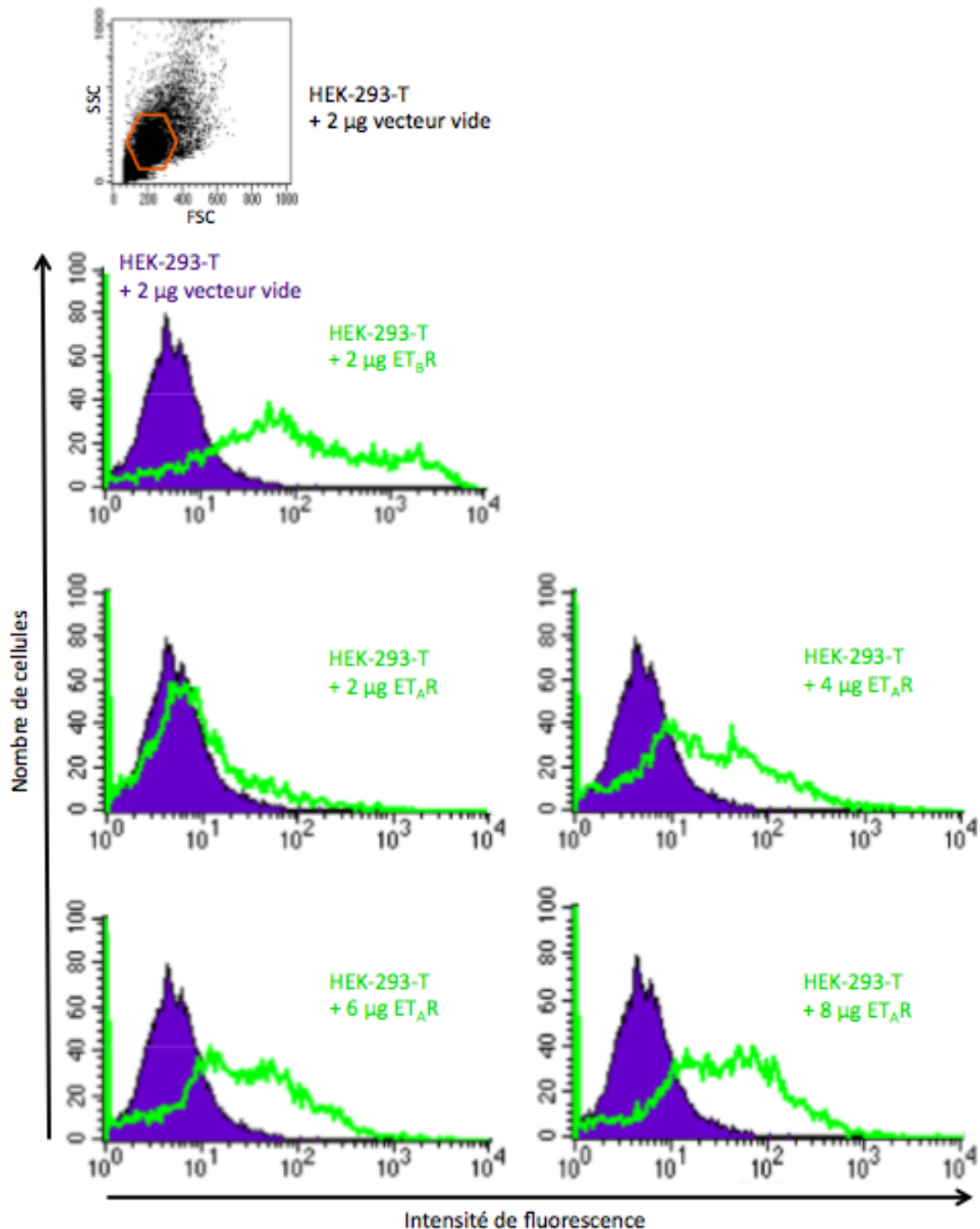


Figure 27. Expression transitoire d'ET_AR et d'ET_BR dans des HEK-293-T. Après 24h de culture, les cellules HEK-293-T, ensemencées à une densité de 200 000 cellules par puits de plaque 6 puits, ont été transfectées avec les ADN plasmidiques codant pour ET_AR ou ET_BR (courbes vertes) ou le vecteur vide (*empty vector*, EV, courbes pleines violettes), aux concentrations indiquées, à l'aide du réactif X-tremeGENE HP (Roche), selon les instructions du fabricant. 72 heures après la transfection, les cellules ont été incubées en présence d'ET-1-FAM et leur intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

Les cellules CHO et HEK-293-T, qui expriment respectivement de façon stable et transitoire ET_AR, dans sa conformation native, à leur surface, sont des outils cruciaux des protocoles d'obtention et de caractérisation des AcM mis en place au sein du laboratoire.

b. Caractérisation pharmacologique de la lignée CHO-ET_AR

Afin de s'assurer de la fonctionnalité du récepteur surexprimé à la surface des cellules, la potentialité de l'ET-1 à activer des voies de signalisation dans les CHO-ET_AR a été testée. Deux voies de signalisation en lien avec la progression tumorale²⁸¹ ont été choisies : la voie des MAPK ERK1/2 (mesure de leur phosphorylation) et la voie des adhésions focales (en suivant la phosphorylation de la kinase FAK).

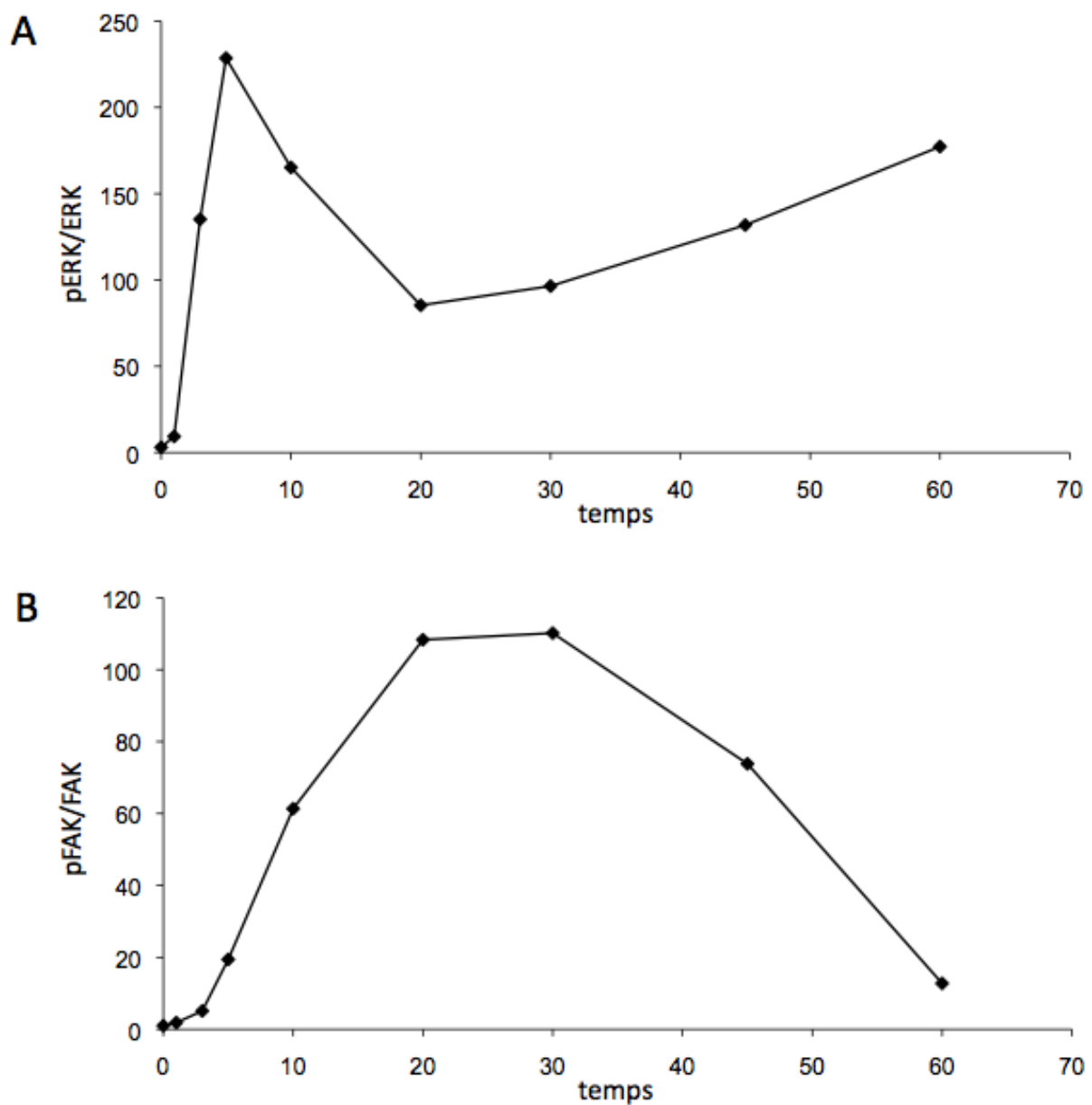


Figure 28. Cinétique d'activation de ERK1/2 et de FAK en réponse à l'ET-1 dans les CHO-ET_AR. Les cellules ont été incubées pendant différents temps avec 10 nM d'ET-1 avant d'être lysées, puis les extraits protéiques totaux ont été analysés par

western blot. Des Ac dirigés contre les formes actives phosphorylées de ERK1/2 (pERK) et contre la forme totale de ERK2 (ERK) ont été utilisés (A) ainsi que des Ac reconnaissant la forme active phosphorylée de FAK (pFAK) et la protéine totale (FAK) (B). (A, B) Les western blots ont été imagés grâce à un scanner Odyssey (CI-COR Biosciences) et quantifiés. Pour chaque échantillon, le niveau de protéine phosphorylée, pERK et pFAK, a été normalisé avec le niveau de protéine totale correspondant, ERK2 et FAK respectivement. La phosphorylation des protéines est représentée en fonction du temps.

La voie des MAPK est connue pour son implication dans les phénomènes de progression tumorale, comme c'est le cas dans le cancer de la prostate⁴⁷³. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet d'ET-1 sur la cinétique d'activation des MAPK dans les CHO-ET_AR. Les MAPK, ERK1 et ERK2, sont activées par MEK1/2 par la phosphorylation de la thréonine et de la tyrosine du motif TEY situé dans la boucle d'activation de ces kinases^{474, 475}. C'est ce motif TEY biphosphorylé, révélateur de l'activité des kinases ERK1/2, qui est reconnu par l'Ac que nous avons utilisé. Comme le montrent les résultats (**Figure 28A**), dans les CHO-ET_AR, les MAPK sont phosphorylées selon une cinétique biphasique en réponse à l'ET-1 : une première phase transitoire de phosphorylation, avec un maximum détecté à 5 min, suivie d'une seconde phase de phosphorylation qui débute à 20 min.

Nous nous sommes également intéressés à la cinétique d'activation de la kinase des adhésions focales (*focal adhesion kinase*, FAK). FAK est impliquée dans la régulation de la formation et le renouvellement des adhésions focales (la protéine tient d'ailleurs son nom du fait qu'elle est fortement enrichie dans ces structures). Par conséquent, cette kinase joue un rôle essentiel dans des processus cellulaires variés tels que l'étalement, l'adhésion, la prolifération, la migration, la survie cellulaire dépendante de l'adhésion, la différenciation ou encore l'angiogenèse^{476, 477}. Différentes études ont en effet mis en évidence le rôle de FAK dans le développement tumoral^{348, 478}. L'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397, qui est une étape clé de son activation, permet la liaison de nombreuses protéines à domaine SH2 (*Src homology 2*) comme Src⁴⁷⁹. C'est cette autophosphorylation de FAK que nous avons suivie en réponse à une stimulation par ET-1. Contrairement à la phosphorylation des MAPK, la phosphorylation de FAK est monophasique, avec un maximum atteint entre 20 et 30 min d'incubation avec l'agoniste (**Figure 28B**). Un retour au niveau basal de phosphorylation de la protéine est observé au bout d'une heure de stimulation du récepteur.

Ces résultats montrent donc clairement que les récepteurs ET_AR exprimés à la surface des cellules CHO-ET_AR sont fonctionnels. Ces cellules seront donc utiles, non

seulement pour le criblage des Ac mais également pour étudier les effets cellulaires des AcM anti-ET_AR produits.

1. 2. Le concept de l'immunisation génique couplée à l'électrotransfert

Le principe général de l'immunisation consiste à injecter d'un Ag étranger chez un hôte et ainsi induire la génération de cellules T et B mémoires (réponse cellulaire) et la présence d'Ac neutralisants dans le sérum (réponse humorale). L'immunisation par l'ADN est un concept qui a émergé au début des années 90. Elle consiste en l'injection d'un ADN plasmidique codant pour un Ag d'intérêt, dans la peau⁴⁸⁰, grâce à un « *gene gun* », ou dans le muscle⁴⁸¹. Il a été montré que l'administration de cet ADN plasmidique était capable de déclencher à la fois une réponse immunitaire humorale^{480, 482} et cellulaire⁴⁸¹ contre l'Ag exprimé *in vivo*. L'immunisation génique a trouvé de nombreux champs d'application tels que les maladies infectieuses⁴⁸¹, les maladies auto-immunes⁴⁸³, les allergies⁴⁸⁴ ou encore le cancer⁴⁸⁵.

Comparée à l'immunisation protéique conventionnelle, l'immunisation génique présente de nombreux avantages. Elle permet notamment de s'affranchir des étapes de production et de purification des protéines recombinantes, beaucoup plus contraignantes et incertaines que la production d'ADN plasmidique et qui constituent bien souvent de ce fait une étape limitante de l'immunisation protéique classique. En effet, les rendements de production parfois extrêmement faibles des protéines, leur instabilité ou encore la difficulté à générer certaines modifications post traductionnelles, sont autant d'arguments en défaveur de l'immunisation protéique. Les RCPG, en raison de leur localisation membranaire (caractère hydrophobe des sept passages transmembranaires), sont précisément des protéines dont la production est difficile. Enfin, la conservation des ADN est bien moins contraignante en terme de conditions de stockage que celle des protéines⁴⁸⁶. Par ailleurs, en produisant lui-même l'Ag *in vivo*, l'organisme immunisé fait office de « bioréacteur »⁴⁸⁷. Ceci permet l'expression de la protéine d'intérêt dans sa conformation native. Cette technique a déjà porté ses fruits au sein du laboratoire puisque, contrairement à une immunisation protéique classique, elle a permis la production d'Ac dirigés contre la conformation native de la protéine prion (PrP)⁴⁸⁸, ouvrant des perspectives en terme d'utilisant thérapeutique de ces Ac. Le procédé d'immunisation génique a donc permis la génération d'Ac, jusqu'alors impossible, contre des cibles difficiles à produire par protéine recombinante. De plus, les facilités de construction et

d'expression *in vivo* des plasmides offrent un choix infiniment plus large pour la production d'Ag.

Au cours des 15 dernières années, l'immunisation génique a été remise au goût du jour grâce à des avancées techniques en terme de design et de mode d'administration du gène d'intérêt, afin d'en améliorer l'assimilation et donc l'expression (e.g. plasmides optimisés, adjuvants). A ce jour, l'électrotransfert (ou électroporation), une technique simple, efficace et sûre qui permet l'introduction d'ADN dans des cellules⁴⁸⁹, a montré une grande efficacité. Ce sont dans un premier temps les travaux *in vitro* réalisés par E. Neumann⁴⁹⁰ qui ont mis en évidence l'intérêt de chocs électriques courts et intenses pour perméabiliser de façon transitoire la membrane et permettre l'entrée de molécules de nature non lipophile. Cette technique a par la suite été appliquée *in vivo*, notamment en chimiothérapie⁴⁹¹. Dans le cadre de l'immunisation, l'électrotransfert a démontré son efficacité, *in vivo*, au niveau du muscle squelettique et, dans une moindre mesure, de la peau⁴⁸⁶. L'injection dans le tissu cible d'une solution d'ADN plasmidique est suivie de l'application de pulses électriques ; l'entrée de l'ADN dans les cellules s'en trouve augmentée. Ce procédé entraînerait une augmentation de l'expression du transgène de 100 à 1000 fois supérieure par rapport à celle observée lors d'une injection simple d'ADN nu⁴⁹². L'amélioration de la transfection et ainsi de l'expression de l'Ag expliquerait l'augmentation de la réponse immunitaire chez l'animal⁴⁹³. Une autre raison de l'efficacité de ce procédé serait liée aux dommages dus aux chocs électriques qui créeraient un contexte inflammatoire provoquant le recrutement des cellules du système immunitaire au site de l'immunisation⁴⁸⁶. L'électroporation agirait donc comme un adjuvant, favorisant la réponse immunitaire et générant des taux importants d'Ac circulants contre l'Ag.

Les mécanismes d'action par lesquels l'injection d'ADN plasmidique induit une réponse immunitaire restent à ce jour relativement peu élucidés. Il semblerait que l'ADN injecté puisse être directement transfecté dans les CPA, fortement représentées dans la peau, mais également présentes dans le muscle, ou alors qu'il soit transfecté dans les myocytes et les kératinocytes. Dans ce dernier cas, l'Ag synthétisé par les cellules pourrait être libéré par sécrétion ou sous forme de peptides dans des corps nécrotiques ou apoptotiques, puis transféré aux CPA. La présentation de l'Ag par les CMH de classe I ou II, ainsi que les phénomènes de co-stimulation, induiraient ainsi une réponse humorale et cellulaire chez l'hôte vacciné (**Figure 29**)⁴⁸⁵. Dans le cas d'un ADN plasmidique codant pour une protéine membranaire, les myocytes et

kératinocytes exprimant la protéine à leur surface pourraient directement remplir le rôle de CPA.

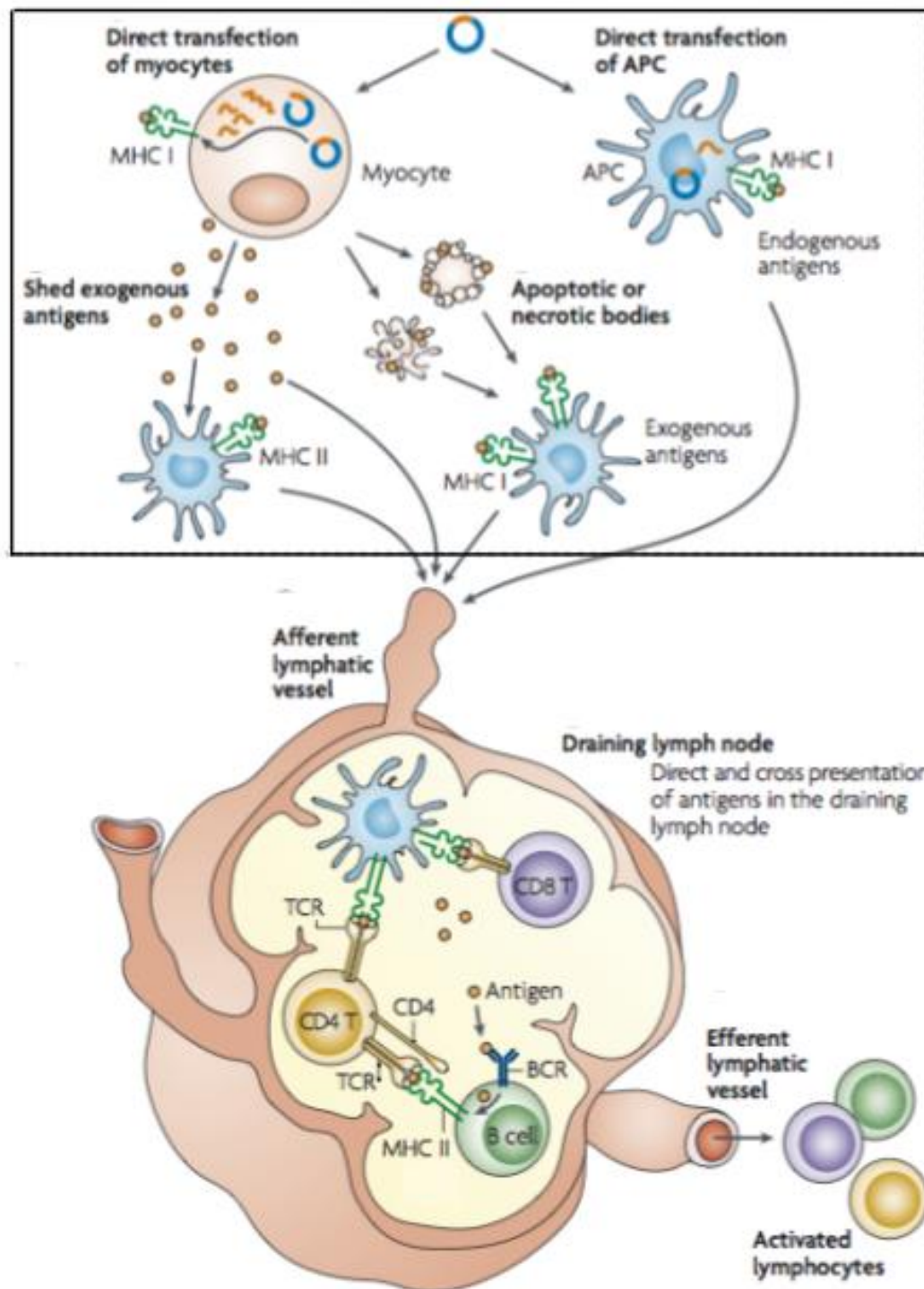


Figure 29. Modèle d'induction de la réponse immunitaire lors de l'immunisation génique. Proposé par Kutzler et Weiner, 2008⁴⁸⁵.

1. 3. Protocole d'immunisation génique

Comme il a été argumenté dans l'introduction de ce manuscrit, les cibles ET_AR et ET_BR sont toutes deux pertinentes pour le développement d'Ac à visée anti-cancéreuse. Cependant, pour des questions pratiques, en particulier en raison de la plus grande facilité à exprimer ET_BR, et donc à disposer de cellules surexprimant le récepteur, le laboratoire s'est dans un premier temps concentré sur la génération et la caractérisation d'anti-ET_BR.

Les travaux de thèse de B. Allard ont confirmé l'efficacité de l'immunisation génique dans le cadre de la production d'Ac spécifiques de la forme native d'ET_BR. La réponse immunitaire des souris a été comparée dans le cadre d'un protocole de « *prime-boost* », qui associe des immunisations géniques et des rappels cellulaires, et dans un protocole de « *boost* », consistant uniquement en des immunisations cellulaires. Seul le protocole dit de *prime-boost* entraîne la génération d'une réponse polyclonale anti-ET_BR significative, démontrant l'intérêt de l'immunisation génique. Le protocole de *prime-boost* permettrait dans un premier temps, grâce à l'immunisation génique, l'initiation d'une réponse hautement spécifique, qui, dans un second temps, serait augmentée par les rappels cellulaires⁴⁹⁴. D'autre part, toujours selon les travaux de thèse de B. Allard, la limitation des rappels cellulaires à deux injections permettrait un meilleur contrôle du bruit de fond imputable à la génération d'Ac dirigés contre des Ag non pertinents. En effet, dès le troisième rappel cellulaire une perte de spécificité de la réponse humorale anti-ET_BR avait été observée.

Dans le but de produire des Ac polyclonaux dirigés contre ET_AR, et en tenant compte des observations faites lors de la production antérieure des Ac anti-ET_BR, des souris BALB/c ont été immunisées selon le protocole optimisé schématisé dans la **figure 30**. Les souris ont été anesthésiées à l'aide de kétamine et de xylazine, à 100 et 10 mg/kg respectivement. Une fois leur patte arrière rasée, ces dernières ont reçu une injection par voie intramusculaire de 50 µg d'ADN plasmidique codant pour le récepteur ET_AR humain, dans un volume de 40 µl, dans le muscle tibial antérieur, *tibialis cranialis*. L'injection a été suivie de chocs électriques, à raison de 8 impulsions de 200 V/cm, 20 ms, à une fréquence de 1 Hz (**Figure 30A**). Cette étape a été répétée 3 fois, à 14 jours d'intervalle. Aux jours 45 et 65 du protocole d'immunisation génique, un rappel a été réalisé en injectant par voie intrapéritonéale 10⁶ cellules HEK-293-T exprimant de façon transitoire ET_AR, dans un volume de 150 µl (**Figure 30B**). Ce type de rappel cellulaire permet une présentation de l'immunogène dans sa

conformation native et son contexte membranaire au système immunitaire de l'animal. Selon le même calendrier et avec les mêmes quantités, les souris contrôles ont quant à elles été immunisées avec le vecteur vide et ont reçu des injections de HEK-293-T transfectées avec le vecteur vide. Le suivi de la réponse humorale polyclonale spécifique a été réalisé grâce à des prélèvements sanguins, comme indiqué dans la **figure 30C**.

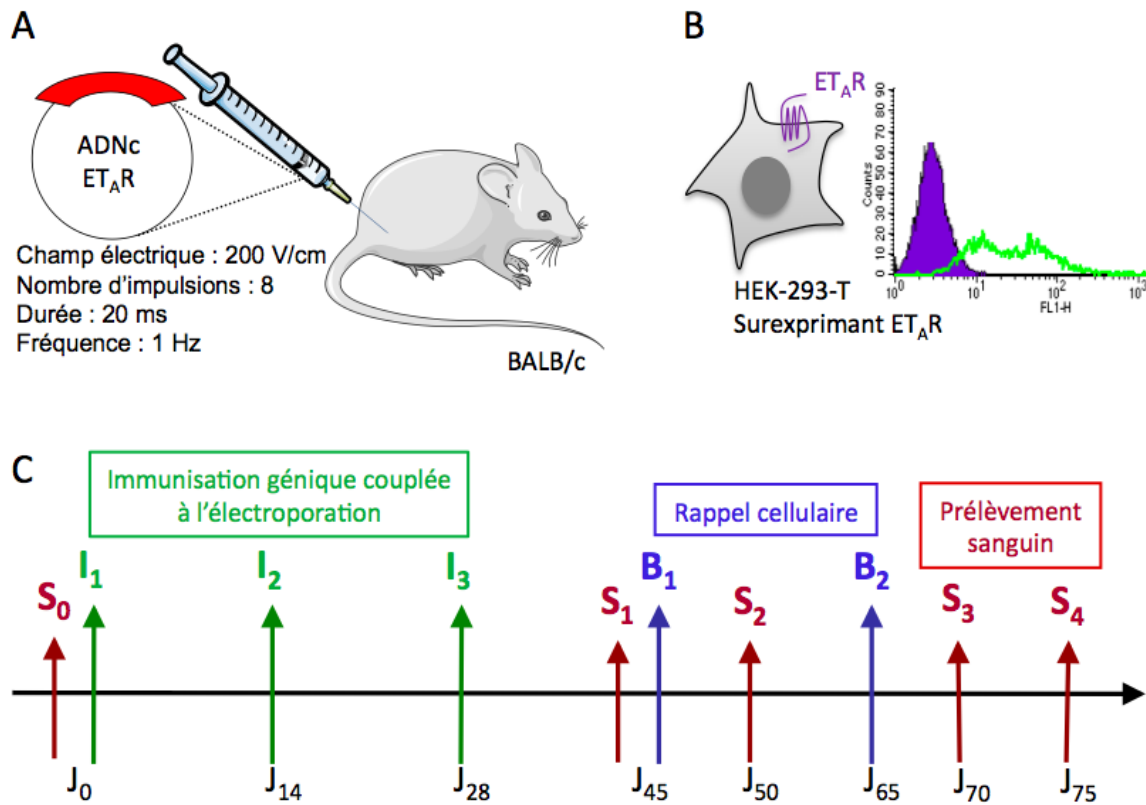


Figure 30. Schéma du protocole d'immunisation génique anti-ET_AR. (A) Les souris BALB/c ont reçu des injections intramusculaires de plasmide suivies de chocs électriques. (B) Des HEK-293-T transfectées avec ce même plasmide ont été injectées par voie intrapéritonéale aux souris. (C) Le protocole est étendu sur 75 jours. B, flèches bleues : « boost », rappel cellulaire ; I, flèches vertes : immunisation génique ; J : jour ; S, flèches rouges : prélèvement sanguin.

2. Production des anticorps monoclonaux anti-ET_AR

2. 1. Choix des souris

Au cours du protocole d'immunisation génique, la réponse polyclonale des souris immunisées contre ET_AR, ainsi que celle des souris contrôles, a été suivie par cytométrie en flux. Les CHO-WT et CHO-ET_AR ont été incubées en présence des sera

obtenus à la suite des prélèvements sanguins (centrifugation 5 min à 1500 rpm des prélèvements et récupération des surnageants). Les résultats présentés dans la **figure 31** montrent que, non seulement les immunisations géniques ne suffisent pas à déclencher une réponse polyclonale anti-ET_AR, mais le premier rappel cellulaire non plus. Finalement, à l'issue de notre protocole d'immunisation génique comprenant trois injections plasmidiques et deux rappels cellulaires, seules deux souris, représentées par des points oranges encadrés, ont présenté une réponse polyclonale dirigée contre le récepteur ET_AR humain qui soit satisfaisante. Ce sont ces deux animaux (souris 3 et 7) qui ont été choisis en vue d'une production d'AcM.

Pour comparaison, après les trois injections d'ADNc couplées à l'électroporation, l'amorce d'une réponse polyclonale dirigée contre ET_BR avait été détectée dans les sera des souris immunisées contre cette cible⁴⁹⁵. De plus, au terme du protocole d'immunisation ayant servi à la génération des Ac dirigés contre ET_BR, bien que la spécificité du signal anti-ET_BR ait été réduite du fait du nombre trop important de rappels cellulaires, toutes les souris immunisées contre le récepteur présentaient une réponse humorale polyclonale spécifique d'ET_BR (thèse B. Allard).

Nous avons pu observer qu'il était difficile d'obtenir *in vitro* une surexpression d'ET_AR (**Figure 27**). A la lumière de ce résultat, il est envisageable que l'expression d'ET_AR *in vivo*, après injection de l'ADNc dans le muscle tibial antérieur, soit moins efficace que celle d'ET_BR. Cette expression d'ET_AR *in vivo* n'a pas fait l'objet d'une investigation plus poussée ; elle aurait pu être contrôlée cinq jours après l'injection de l'ADNc couplée à l'électroporation, par dissociation du muscle et incubation avec le ligand marqué. Une corrélation a été démontrée entre le niveau d'expression de l'Ag et celui de la réponse immunitaire^{493, 496}. L'hypothèse d'un *prime-boost* peu efficace est soutenue par les valeurs brutes (non montrées) de MFI, sur les CHO-WT, obtenues avec les derniers prélèvements sanguins. En effet, chez certaines souris, contrôles ou immunisées contre ET_AR, ces valeurs de MFI sont élevées, ce qui atteste de la génération non négligeable d'Ac dirigés contre des Ag non pertinents exprimés à la surface des cellules CHO.

Une première campagne d'immunisation génique, dont les résultats ne sont pas présentés ici, visant à produire une réponse humorale anti-ET_AR, a été réalisée. Un protocole similaire à celui présenté dans la **figure 30** avait été suivi, à l'exception des rappels cellulaires qui avaient été réalisés avec des CHO-ET_AR, ou CHO-WT pour les individus contrôles. Il s'agissait de déterminer s'il était possible d'observer un différentiel de liaison des sera des souris à la surface des CHO-WT et des CHO-ET_AR,

en cytométrie en flux. En raison d'un signal de liaison non spécifique trop important, cette approche a été écartée, ne pouvant permettre un suivi pertinent de la réponse polyclonale. Ceci était probablement dû à la dilution trop importante des Ac spécifiques d'ET_AR parmi ceux dirigés contre les nombreux autres Ag présentés par les CHO. Pourtant, l'expression plus forte du récepteur dans la lignée stable CHO-ET_AR que dans les HEK-293-T serait susceptible de rendre les rappels cellulaires plus efficaces. C'est alors la stratégie du suivi de la réponse polyclonale qui ne devrait pas reposer sur l'utilisation exclusive des cellules CHO.

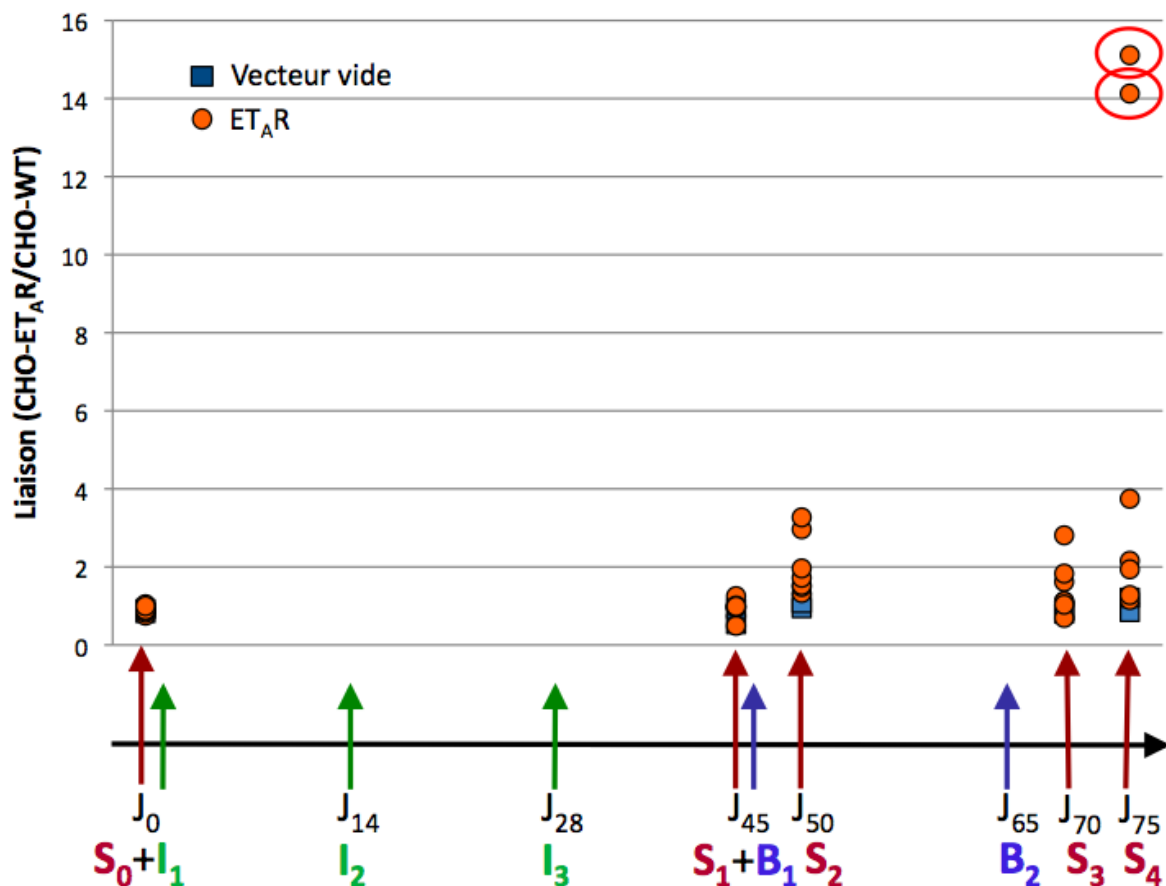


Figure 31. Suivi de la réponse humorale polyclonale spécifique d'ET_AR, chez les Balb/c, au cours du protocole d'immunisation génique. Les souris témoins, représentées par des carrés bleus, ont été injectées avec le vecteur vide. Les souris représentées par des ronds oranges ont été immunisées contre ET_AR. Les cellules CHO-WT et CHO-ET_AR ont été incubées en présence de chaque prélèvement sanguin dilué au 1/100^e, pendant 24 h, à 4°C. La liaison des Ac polyclonaux a été révélée avec un Ac anti-souris couplé à la R-phycoérythrine (R-PE). La liaison des Ac a été mesurée par cytométrie en flux. Pour chaque échantillon, la liaison à CHO-ET_AR a été normalisée avec le signal correspondant obtenu avec les CHO-WT. Les ronds oranges entourés correspondent aux souris sélectionnées pour la fusion. B, flèches bleues : « boost », rappel cellulaire ; I, flèches vertes : immunisation génique ; J : jour ; S, flèches rouges : prélèvement sanguin.

2. 2. Mise au point du test de criblage des hybridomes

Dans le but de pouvoir sélectionner de façon rapide les hybridomes sécréteurs d'Ac dirigés contre notre cible, ET_AR, un test de criblage précédemment utilisé au laboratoire⁴⁹⁵ a été adapté et optimisé selon nos besoins. La mise au point de ce test ELISA sur cellules non fixées a été réalisée grâce aux sera des souris, prélevés lors de l'ultime saignée du protocole d'immunisation génique anti-ET_AR. Ce test de criblage, qui est basé sur la reconnaissance de la forme native du récepteur exprimé à la surface des cellules, a consisté à comparer les signaux obtenus après incubation des Ac avec les cellules CHO surexprimant ou non ET_AR.

Pour ce faire, des cellules CHO-ET_AR cultivées à confluence en flasks 75 cm² ont été lavées en D-PBS et collectées après avoir été incubées en tampon versène (D-PBS, 8 mM EDTA) à 37°C, pendant 10 min. 10⁵ cellules ont été déposées par puits de plaque 96 puits à fond v et les plaques ont été centrifugées afin d'éliminer le surnageant. Les cellules ont été resuspendues dans 100 µl de serum de souris, dilué en D-PBS/0,1% BSA/5% de sérum normal de chèvre (SNC), selon les concentrations indiquées dans la **figure 32**, pendant 24 h, à 4°C. Après élimination des sera dilués, les cellules ont été lavées deux fois avec 150 µl de D-PBS/0,1% BSA/1% SNC. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 h, à 4°C, avec 50 µl d'Ac traceur, anti-souris conjugué à l'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7), dilué à 1 Unité Ellman (UE) en D-PBS/0,1% BSA/5% SNC. Après trois lavages avec 150 µl de D-PBS/0,1% BSA/1% SNC, les cellules ont été resuspendues dans 200 µl de réactif d'Ellman⁴⁹⁷ afin de mesurer l'activité de l'acétylcholinestérase. Une fois la réaction suffisamment avancée (30 min à 2 heures d'incubation à température ambiante), l'absorbance des surnageants a été mesurée à 414 nm. Le même protocole a été réalisé en parallèle en utilisant des CHO-WT. Pour chaque échantillon, le signal spécifique obtenu avec les cellules CHO-ET_AR a été comparé au bruit de fond obtenu avec les CHO-WT.

A CHO-ET_AR

	mc 1 S4	mc 2 S4	m 1 S4	m 2 S4	m 3 S4	m 4 S4	m 5 S4	m 6 S4	m 7 S4	S0	S0	S0
1/100	0,521	0,536	0,566	0,798	0,622	0,763	0,687	0,609	0,768	0,144	0,139	0,176
1/1 000	0,175	0,184	0,191	0,302	0,209	0,273	0,216	0,130	0,280	0,028	0,023	0,027
1/10 000	0,031	0,029	0,035	0,053	0,048	0,048	0,046	0,029	0,056	0,012	0,014	0,009
1/100 000	0,007	0,021	0,017	0,027	0,021	0,031	0,025	0,019	0,024	0,017	0,015	0,02

B CHO-WT

	mc 1 S4	mc 2 S4	m 1 S4	m 2 S4	m 3 S4	m 4 S4	m 5 S4	m 6 S4	m 7 S4	S0	S0	S0
1/100	0,708	0,75	0,751	0,829	0,721	0,805	0,662	0,703	0,653	0,154	0,095	0,199
1/1 000	0,249	0,202	0,228	0,284	0,217	0,249	0,243	0,156	0,240	0,034	0,021	0,032
1/10 000	0,082	0,046	0,048	0,047	0,043	0,048	0,042	0,03	0,051	0,019	0,015	0,020
1/100 000	0,035	0,028	0,025	0,025	0,017	0,021	0,022	0,021	0,016	0,014	0,015	0,013

C Rapport signal CHO-ET_AR/CHO-WT

	mc 1 S4	mc 2 S4	m 1 S4	m 2 S4	m 3 S4	m 4 S4	m 5 S4	m 6 S4	m 7 S4	S0	S0	S0
1/100	0,736	0,715	0,754	0,963	0,863	0,948	1,038	0,866	1,176	0,935	1,463	0,884
1/1 000	0,703	0,911	0,838	1,063	0,963	1,096	0,889	0,833	1,167	0,824	1,095	0,844
1/10 000	0,378	0,630	0,729	1,128	1,116	1,000	1,095	0,967	1,098	0,632	0,933	0,450
1/100 000	0,200	0,750	0,680	1,080	1,235	1,476	1,136	0,905	1,500	1,214	1,000	1,538

Figure 32. Réponse humorale polyclonale testée en ELISA sur cellules. Les saignées ont été diluées du 1/100 au 1/100 000 et testées en ELISA sur les CHO-ET_AR (A) et les CHO-WT (B) pendant 24 h, à 4°C. L'absorbance à 414 nm de chaque puits correspondant à CHO-ET_AR a été rapportée à celle obtenue avec les CHO-WT correspondantes (C). En bleu et en rouge sont indiqués les rapports >1. Les valeurs entourées sont celles obtenues pour les souris sélectionnées pour la fusion à l'issue des mesures de cytométrie en flux. m : « mouse », souris immunisée contre ET_AR ; mc : souris contrôle, immunisée contre le vecteur vide ; S0 : prélèvement sanguin effectué à J0 ; S4 : prélèvement sanguin effectué à J75.

Les résultats présentés dans la **figure 32** ont été obtenus grâce au protocole d'ELISA sur cellules en suspension détaillé ci-dessus. Les ultimes prélèvements sanguins (S4) des souris du protocole d'immunisation anti-ET_AR (m 1 à 7) ont été dosés. Alors qu'en cytométrie en flux le marquage des Ac spécifiques était environ 15 fois plus élevé sur les CHO-ET_AR que sur les CHO-WT (**Figure 31**), reflétant un taux important d'Ac spécifiques, les rapports des signaux obtenus sur cellules surexprimant le récepteur par rapport aux cellules non transfectées sont ici très faibles. Les saignées de souris naïves (S0), choisies au hasard, ont servi de contrôle négatif. Malheureusement, en fonction de la souris et de la dilution, les rapports « signal CHO-ET_AR/CHO-WT » sont parfois plus élevés que pour S4 des souris ayant reçu l'immunogène, alors qu'ils devraient tous avoisiner 1. En revanche, quelle que soit la dilution de la saignée S4, aucune réponse spécifique d'ET_AR n'est mise en évidence pour les souris immunisées avec le vecteur vide. Il est clair ici que bien que les meilleures conditions expérimentales aient été retenues, en terme de temps de réaction ou encore de choix des types de plaques, ce test ELISA de criblage sur cellules en suspension n'aurait pas été suffisant pour pouvoir sélectionner les souris à partir desquelles la fusion cellulaire a été réalisée. Toutefois, considérant que ce test de criblage était dédié au dosage des surnageants d'hybridomes, donc des solutions d'AcM, il a été décidé qu'il serait appliqué tel que.

2. 3. Obtention des anticorps anti-ET_AR par fusion cellulaire

La **figure 33** présente les différentes étapes qui, à partir des deux souris ayant le mieux répondu au protocole d'immunisation génique précédemment détaillé, ont conduit à l'obtention d'AcM dirigés contre ET_AR.

En dépit d'une immunisation génique probablement peu efficace, si l'on tient compte du suivi de la réponse polyclonale spécifique, les souris 3 et 7, présentant les meilleurs taux d'Ac anti-ET_AR, ont été retenues pour produire des hybridomes.

Quatre jours avant la fusion, les deux souris ont reçu chacune un rappel cellulaire de HEK-293-T exprimant transitoirement ET_AR : une injection intrapéritonéale de $2 \cdot 10^6$ cellules dans un volume de 200 μ l et une injection intraveineuse de 10^6 cellules dans un volume de 50 μ l. La fusion cellulaire a été réalisée comme précédemment décrit⁴⁹⁷. Les splénocytes collectés à partir des rates des meilleures souris ont été fusionnés à des cellules de myélome murin NS1. 20 plaques de 96 puits ont ainsi été

ensemencées. L'observation au microscope a permis de montrer que lors de cette fusion « ET_AR » des hybridomes ont été générés dans 578 des 1920 puits.

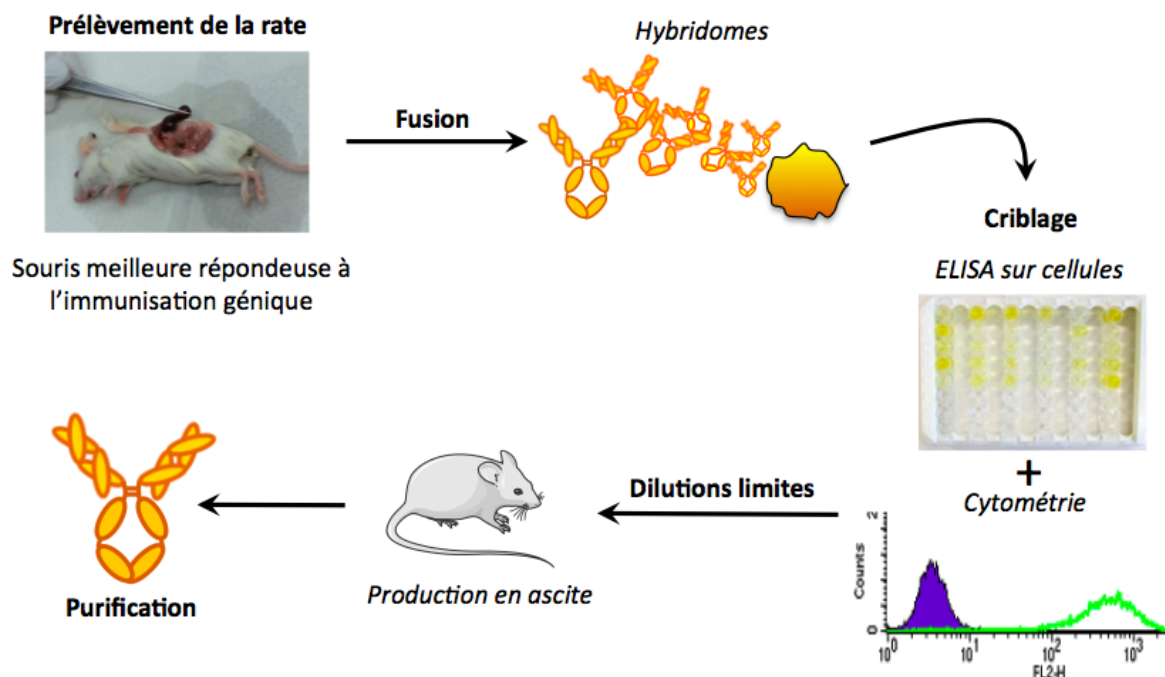


Figure 33. Schéma du protocole d'obtention des anticorps monoclonaux.

Dix jours après la fusion, les milieux de culture des 20 plaques, dilués au 1/10^e, ont été testés sur les CHO-WT et CHO-ET_AR, selon la méthode d'ELISA sur cellules vivantes en suspension. La **figure 34** montre les valeurs d'absorbance obtenues pour les CHO-ET_AR (**Figure 34A**) ou les CHO-WT (**Figure 34B**) pour la plaque numéro 4 de la fusion. Sur cette plaque, le criblage en ELISA a permis d'identifier un hybridome positif, le 4 C5. En effet, sur CHO-ET_AR, le signal du puits C5 est presque 3 fois plus élevé que le bruit de fond de la plaque et aucun signal spécifique n'a été observé avec les CHO-WT, confirmant la spécificité des Ac produits pour la cible ET_AR.

Afin de s'assurer qu'aucun hybridome sécrétant d'Ac dirigés contre ET_AR n'ait été écarté, les surnageants des 578 puits contenant des cellules ont également été criblés en cytométrie en flux en utilisant un Ac secondaire couplé à la R-PE. La **figure 35** présente quelques-uns des résultats obtenus lors de ce criblage complémentaire. En rouge figurent les hybridomes considérés comme positifs, dont le 4 C5 qui avait été précédemment retenu grâce à l'ELISA.

Bien que les deux techniques employées pour le criblage aient été concluantes, dans le cas de l'hybridome 4 C5, en cytométrie en flux, un signal 66,2 fois plus important a été mesuré sur la lignée surexprimant le récepteur (**figure 35**), alors

qu'en ELISA sur cellules il n'était que 2,3 fois plus important (**figure 34**). Finalement, parmi les 5 puits considérés comme positifs lors du criblage en ELISA, un seul a été écarté, très probablement pour des raisons d'instabilité de l'hybridome généré. Le criblage par cytométrie en flux, plus sensible, a conduit à retenir d'avantage d'hybridomes (présentant souvent un bruit de fond plus fort sur CHO-WT), qui par la suite ont été éliminés. L'ELISA sur cellules vivantes en suspension apparaît donc être la technique la plus performante dans notre cas.

Les hybridomes révélés positifs en cytométrie en flux ont été transférés en plaques 48 puits. Suite à cette première phase d'expansion, les surnageants des hybridomes ont de nouveau été analysés en cytométrie en flux, purs et dilués au $1/10^6$. Les hybridomes sécréteurs d'Ac spécifiques d'ET_AR ont ensuite été sous-clonés par des étapes successives de dilution limite, permettant d'une part l'obtention de clones purs et d'autre part l'élimination des hybridomes instables dans le temps. A l'issue de ces étapes, quatre clones, présentant les meilleurs marquages fluorescents en cytométrie en flux et les signaux les plus forts en ELISA sur cellules, ont été retenus, issus des puits de fusion 4 C5, 8 G3, 15 G1 et 15 G2. Dans la suite de ce manuscrit, les AcM qu'ils produisent seront respectivement nommés mAb-A1, mAb-A2, mAb-A3 et mAb-A4. Finalement, les 4 hybridomes ont de nouveau fait l'objet d'une expansion avant d'être congelés (SVF/10% DMSO).

A	CHO-ET _A R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	0,072	0,069	0,070	0,068	0,074	0,080	0,070	0,072	0,071	0,078	0,069	0,065
	B	0,074	0,073	0,102	0,079	0,077	0,083	0,081	0,075	0,073	0,073	0,075	0,071
	C	0,083	0,071	0,080	0,076	0,222	0,074	0,075	0,070	0,073	0,073	0,071	0,068
	D	0,111	0,086	0,079	0,080	0,082	0,078	0,079	0,074	0,079	0,072	0,068	0,068
	E	0,073	0,071	0,072	0,074	0,078	0,080	0,074	0,072	0,075	0,071	0,071	0,068
	F	0,074	0,073	0,072	0,076	0,073	0,076	0,077	0,081	0,075	0,072	0,069	0,064
	G	0,074	0,071	0,071	0,074	0,072	0,073	0,071	0,070	0,074	0,072	0,071	0,070
	H	0,070	0,070	0,076	0,071	0,091	0,073	0,072	0,069	0,072	0,075	0,091	0,072

B	CHO-WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	0,095	0,093	0,089	0,091	0,091	0,088	0,085	0,085	0,085	0,089	0,088	0,092
	B	0,093	0,096	0,093	0,093	0,093	0,091	0,089	0,088	0,088	0,091	0,092	0,100
	C	0,084	0,091	0,091	0,090	0,097	0,088	0,088	0,085	0,088	0,085	0,102	0,081
	D	0,100	0,091	0,092	0,090	0,093	0,093	0,092	0,09	0,089	0,092	0,088	0,090
	E	0,093	0,096	0,088	0,097	0,088	0,086	0,086	0,088	0,087	0,087	0,087	0,084
	F	0,097	0,093	0,094	0,094	0,094	0,091	0,087	0,091	0,088	0,086	0,087	0,085
	G	0,090	0,093	0,086	0,086	0,089	0,088	0,089	0,088	0,085	0,086	0,086	0,080
	H	0,089	0,09	0,091	0,087	0,095	0,088	0,086	0,089	0,089	0,085	0,094	0,078

Figure 34. Premier criblage par ELISA sur cellules après fusion. 10 jours après la fusion, tous les surnageants de culture ont été prélevés, dilués au 1/10^e et testés en ELISA sur cellules. Les surnageants ont été incubés pendant 24 h, à 4°C, avec les cellules CHO-ET_AR (A) ou CHO-WT (B). Les résultats obtenus pour les surnageants d'une des plaques 96 puits de la fusion sont retranscrits (A, B). Le puits C5 (valeur en rouge) est considéré comme positif.

puits fusion	puits Guava	CHO-ET _A R (MFI)	CHO-WT (MFI)
1 F1	A01	4,39	4,93
1 C11	A02	4,38	4,87
2 F1	A03	4,6	4,75
2 A6	A04	5,53	5,15
2 F10	A05	5	5,2
2 D12	A06	6,86	7,52
3 A8	A07	5,12	5,46
3 A12	A08	4,87	5,28
4 C5	A09	358,88	5,42
4 B8	A10	5,64	5,17
5 B4	A11	5,25	5,11
7 F7	B09	5,23	5,17
7 C9	B10	6,17	5,29
8 G3	B11	186,76	22,17
8 D12	B12	12,11	11,88
9 C2	C01	4,67	5,39
14 G5	D09	5,67	5,14
14 B11	D10	5,49	5,57
15 C1	D11	5,99	5,48
15 G1	D12	494,81	6,38
15 H1	E01	8,71	6,08
15 G2	E02	888,55	6,75
15 C4	E03	62,93	118,22
15 F10	E04	6,71	5,16
16 A1	E05	5,06	5,39
16 H2	E06	5,35	5,36
16 F12	E07	5,86	6,14
16 G12	E08	5,39	5,76
17 B5	E09	4,79	5,41
17 B11	E10	5,46	5,64
19 E1	E11	5,05	6,27
m 3 S4	F01	294,99	69,81
m 3 S4 SR	F02	276,67	181,46
m 3 S4 SR 1/10	F03	20,96	15,71
m 3 S4 SR 1/100	F04	9,94	6,32
Ac secondaire	F05	5,13	5,56
cellules seules	F06	2,91	2,65
cellules seules	F07	2,91	2,61
cellules seules	F08	2,95	2,56

Figure 35. Criblage des puits de fusion positifs par cytométrie en flux. Les surnageants de tous les puits présentant des hybridomes ont été criblés en cytométrie en flux. Les surnageants purs ont été incubés avec les cellules CHO-ET_AR ou CHO-WT, pendant 24 h, à 4°C. Le signal a été révélé avec un Ac anti-souris couplé à la R-PE. Les intensités de fluorescence moyenne (MFI) ont été mesurées au cytomètre de flux GUAVA. Les lignes indiquées en rouge correspondent aux surnageants considérés positifs. m : « *mouse* », souris immunisée contre ET_AR ; SR : surnageant de rate de la fusion cellulaire ; S4 prélèvement sanguin effectué à J75.

Anticorps anti-ET _A R	Isotype
mAb-A1	IgG3
mAb-A2	IgM
mAb-A3	Ig2a
mAb-A4	Ig2b

Figure 36. Isotypes des 4 anticorps anti-ET_AR obtenus.

Les 4 AcM issus des hybridomes ont été isotypés à l'aide d'un kit d'isotypage d'immunoglobuline de souris, selon les instructions du fournisseur (Pierce) (**Figure 37**). Enfin, les 4 AcM ont été purifiés à partir de liquide d'ascite de souris irradiées, par chromatographie d'affinité sur protéine A-sepharose (Millipore). Leur pureté et leur intégrité ont été vérifiées par électrophorèse.

C. Caractérisation des anticorps monoclonaux anti-ET_AR

1. Les anti-ET_AR reconnaissent spécifiquement le récepteur A humain des endothélines

De la même façon que la reconnaissance d'ET_AR a été vérifiée tout au long du processus de criblage des hybridomes, la première étape de la caractérisation des anti-ET_AR a consisté à étudier leur spécificité de liaison pour le récepteur, par des expériences de cytométrie en flux. Pour ce faire, les CHO-ET_AR ont été incubées avec 100 nM d'Ac anti-ET_AR purifié et leur liaison révélée à l'aide d'un Ac anti-souris fluorescent. Les résultats présentés dans la **figure 37** sont ceux qui ont été obtenus avec le mAb-A1. Tandis qu'aucun signal fluorescent n'a été détecté à la surface des CHO-WT, les CHO-ET_AR ont été reconnues par le mAb-A1. Les trois autres Ac ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec le mAb-A1. Les quatre Ac sélectionnés par le criblage consécutif à la fusion semblent donc reconnaître de façon spécifique ET_AR.

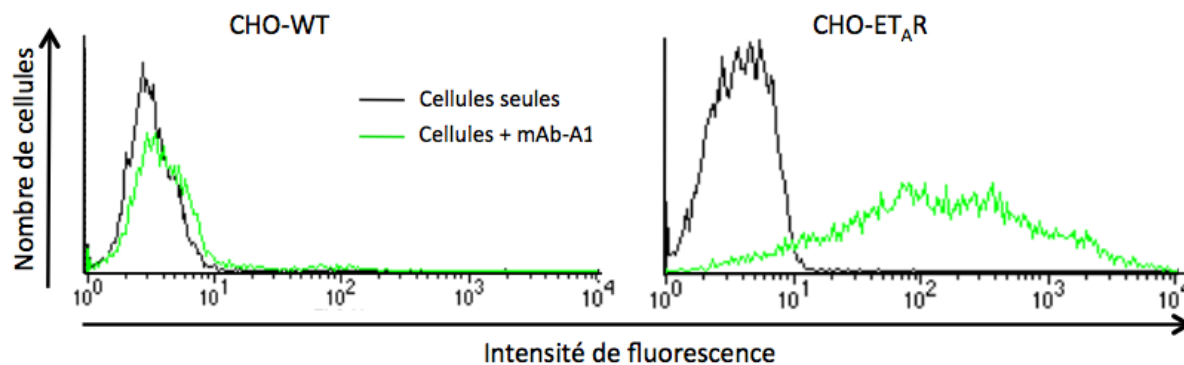


Figure 37. Liaison spécifique du mAb-A1 sur ET_AR à la surface de cellules CHO.

Les CHO-WT et CHO-ET_AR non fixées ont été incubées dans du tampon seul (courbes noires) ou en présence de 100 nM de mAb-A1 (courbes vertes) pendant 24 h, à 4°C. La liaison a été évaluée grâce à un Ac anti-souris couplé à la R-PE. L'intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

Dans le but de caractériser plus précisément la liaison des Ac anti-ET_AR à la lignée CHO-ET_AR, des expériences de saturation ont également été réalisées. Les CHO-ET_AR ont été incubées avec des concentrations croissantes d'Ac. De telles expériences donnent accès à des paramètres cruciaux tels que la concentration efficace médiane (EC₅₀), qui traduit l'affinité apparente de l'Ac pour ET_AR, et la valeur de MFI atteinte au plateau, qui renseigne sur le nombre de sites de fixation de l'Ac sur la cellule (assimilable au B_{MAX}).

Comme pour toutes les expériences de liaisons présentées dans cette partie C., l'incubation a été réalisée à 4°C, afin d'éviter tout phénomène d'endocytose de l'Ac qui viendrait biaiser les résultats. Ne sont présentés dans la **figure 38** que les résultats obtenus pour les trois IgG, celles-ci étant générées de façon moins précoce que l'IgM au cours de la réponse immunitaire. Quel que soit l'Ac anti-ET_AR considéré, une liaison dose dépendante et saturable, c'est à dire caractéristique qu'une liaison spécifique, a été mise en évidence. Les EC₅₀ calculées grâce au logiciel GraphPad Prism, sont sub-nanomolaires, ce qui reflète une forte affinité des Ac pour ET_AR. Cette reconnaissance saturable et de haute affinité des quatre Ac anti-ET_AR, sur CHO-ET_AR, valide le test de criblage des hybridomes qui a été appliqué à l'issue de la fusion.

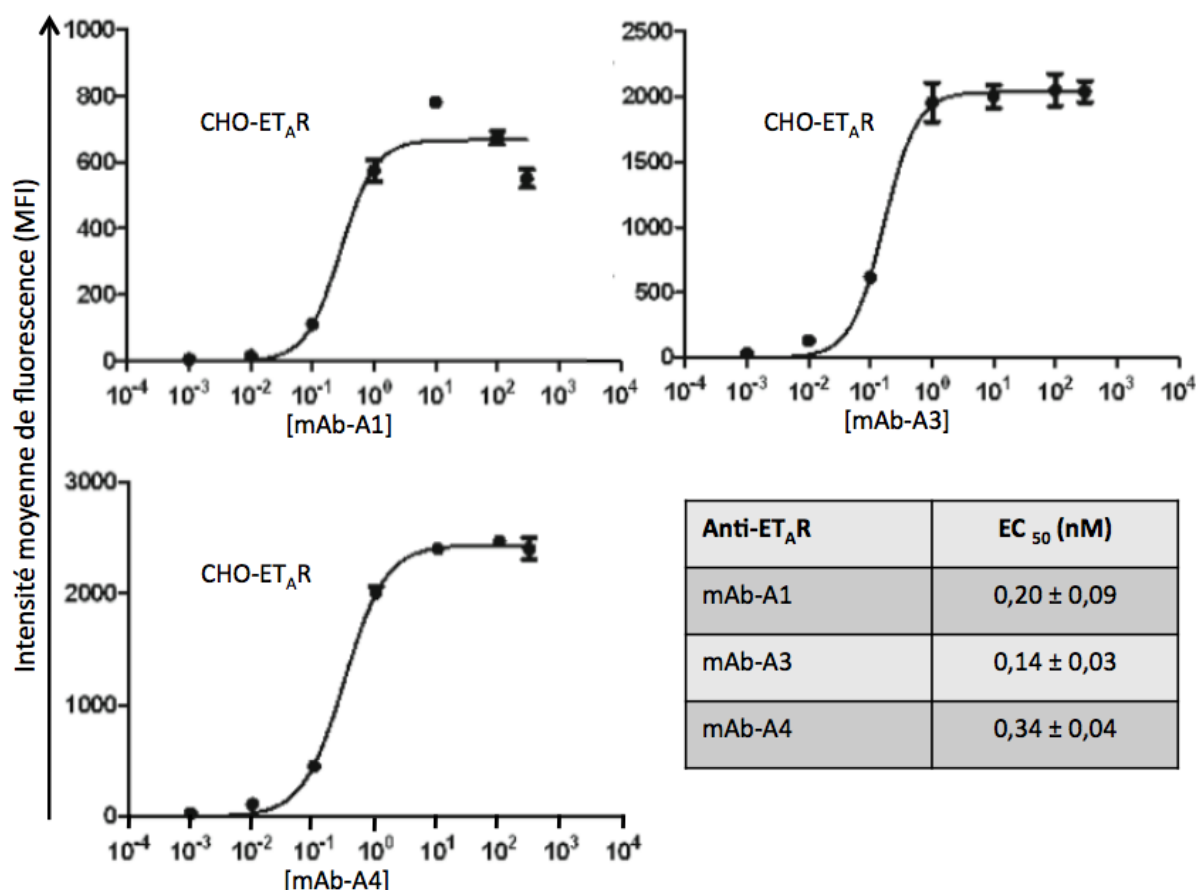


Figure 38. Etude de la liaison à l'équilibre des anticorps monoclonaux anti-ET_AR. Les CHO-ET_AR non fixées ont été incubées avec des concentrations croissantes d'Ac mAb-A1, mAb-A3 ou mAb-A4, pendant 24 h, à 4°C. La liaison des Ac a été quantifiée en utilisant un Ac anti-souris couplé à la R-PE, puis mesurée par cytométrie en flux. Les courbes résultantes, correspondant à l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) en fonction des concentrations en Ac, ont été tracées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les affinités apparentes (EC₅₀, pour concentration efficace médiane) des Ac, correspondant à la moyenne ± s.d. de deux expériences indépendantes, sont récapitulées dans le tableau.

Étonnamment, les intensités maximales de fluorescences obtenues avec les trois IgG anti-ET_AR, qui correspondent à leur B_{MAX}, sont différentes. En effet, les mAb-A3 et mAb-A4 présentent des MFI au plateau du même ordre de grandeur, mais près de trois fois supérieures à celle obtenue avec le mAb-A1.

Ces variations de B_{MAX} suggèrent très fortement que d'un Ac à l'autre il existe un nombre différent d'épitopes à la surface des cellules CHO-ET_AR. On peut aisément imaginer que cette variation du nombre d'épitopes soit due à une accessibilité différente de certaines parties du récepteur. La formation de dimères, qui a déjà été observée dans le cas des récepteurs des ET^{84, 85}, pourrait par exemple engendrer l'apparition de nouveaux sites de fixation impliquant des récepteurs proches, ou au contraire masquer certains épitopes, induisant alors la réduction du nombre de sites.

Cette hypothèse pourrait être renforcée ou infirmée par une étude précise des épitopes reconnus par les Ac, grâce à des approches de « *pepscan* » et de mutagenèse dirigée.

Il n'est pas à exclure non plus que la liaison des IgG étudiées soit dépendante de modifications post-traductionnelles des récepteurs.

Par ailleurs, les trois Ac étant d'isotypes distincts, il n'est pas possible de porter de conclusion quant à l'implication de la classe isotypique dans les variations de B_{MAX} observées.

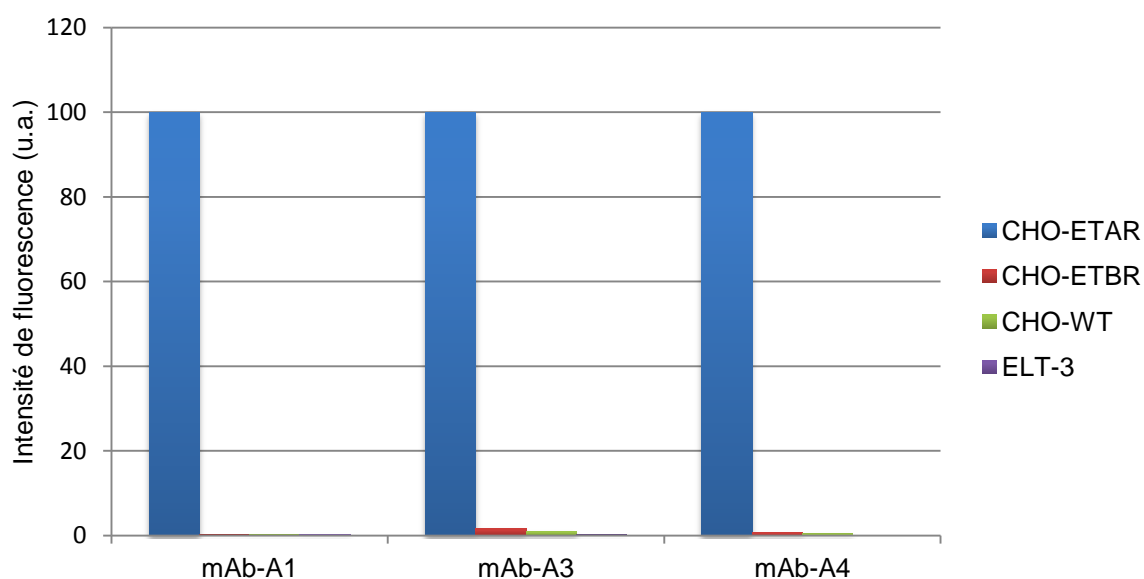


Figure 39. Spécificité de liaison des anticorps anti-ET_AR humain. Les cellules des lignées CHO-ET_AR (bleu), CHO-ET_BR (rouge), CHO-WT (vert) et ELT-3 (violet) ont été incubées avec les Ac mAb-A1, mAb-A3 et mAb-A4 pendant 24 h, à 4°C. La liaison a été révélée à l'aide d'un Ac anti-souris couplé à la R-PE. L'intensité de fluorescence moyenne a été mesurée par cytométrie en flux. Pour chaque Ac, le signal le plus fort a été arbitrairement fixé à 100.

La spécificité de la liaison des anti-ET_AR a été étudiée en cytométrie en flux (**Figure 39**). Pour cela quatre lignées ont été utilisées : les CHO-WT, ne surexprimant pas les récepteurs des ET ; les CHO-ET_AR et les CHO-ET_BR⁴⁶⁶, qui surexpriment respectivement les récepteurs ET_AR et ET_BR humains ; les cellules ELT-3, lignée de léiomyome de rate qui exprime les formes murines de ET_AR et ET_BR⁴⁹⁸. Une immunoglobuline contrôle commerciale a été utilisée et n'a pas généré pas de marquage sur les quatre lignées (résultat non présenté). Quel que soit l'anti-ET_AR considéré, la liaison détectés à la surface des CHO-WT, CHO-ET_BR et des ELT-3 est quasiment nulle en comparaison à celle obtenue après incubation des Ac avec les CHO-ET_AR. Ces résultats mettent en évidence une liaison hautement spécifique vis à

vis d'ET_AR humain des mAb-A1, mAb-A3 et mAb-A4. Ces Ac ne semblent reconnaître ni le récepteur ET_BR humain, ni les récepteurs murins des ET.

2. Un des anti-ET_AR inhibe la liaison de l'endothéline à ET_AR

Afin de mieux caractériser la liaison des Ac anti-ET_AR et de savoir s'ils sont capables d'interférer avec la liaison de l'ET à la surface des CHO surexprimant ET_AR, des expériences de compétition avec le ligand marqué ont été réalisées. Elles ont consisté à étudier par cytométrie en flux la liaison de l'ET-1-FAM à la surface des CHO-ET_AR en présence de concentrations croissantes d'Ac. Les résultats présentés dans la **figure 40** sont ceux obtenus avec le mAb-A1. La liaison de l'ET-1-FAM est réduite par l'antagoniste spécifique d'ET_AR, le BQ123, avec une valeur de concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'ordre de 5 nM. L'effet maximal, correspondant à une inhibition totale de la liaison d'ET-1-FAM, est atteint pour des concentrations de BQ123 au-delà de 300 nM. Au contraire, le BQ788, antagoniste spécifique d'ET_BR, n'a pas eu d'effet sur la liaison de l'ET-1-FAM à la membrane des CHO-ET_AR. Ces résultats obtenus avec les BQ123 et BQ788 confirment que la lignée utilisée présente exclusivement ET_AR à sa surface. Comme attendu, le contrôle isotypique a été dépourvu d'effet sur la liaison du ligand marqué. L'incubation conjointe des CHO-ET_AR avec l'ET-1-FAM et des concentrations croissantes de mAb-A1 a entraîné une diminution du marquage fluorescent des cellules, indiquant que l'Ac a exercé une inhibition sur la liaison du ligand marqué, et ce de manière dose dépendante. L'IC₅₀ obtenue avec le mAb-A1, proche de celle obtenue avec le BQ123, indique que l'Ac est un bon inhibiteur de la liaison de l'ET-1 sur ET_AR. Si on considère que cette inhibition est due à une compétition entre l'ET-1 et l'Ac, ce résultat suggère que les sites de liaison du mAb-A1 et de l'ET-1 sur le récepteur sont proches, voire confondus, au niveau de la structure tridimensionnelle du récepteur. La compétition entre les deux ligands reste cependant à démontrer.

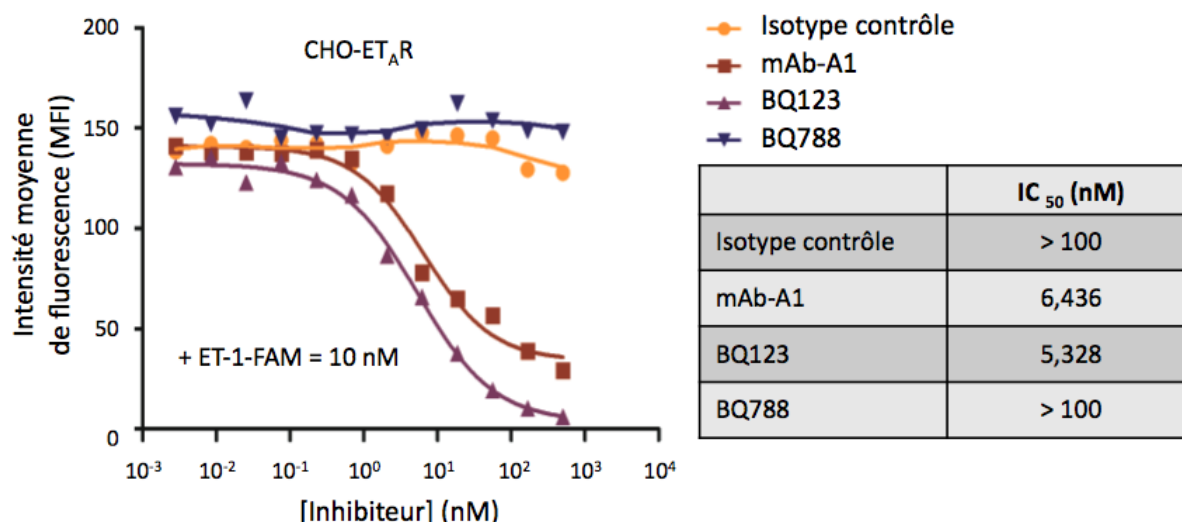


Figure 40. Compétition de l'ET-1-FAM avec le mAb-A1 pour la liaison sur CHO-ET_AR. Les CHO-ET_AR ont été simultanément incubées avec 10 nM d'ET-1-FAM et des concentrations croissantes d'Ac contrôle, de mAb-A1 ou d'antagonistes spécifiques d'ET_AR et d'ET_BR (respectivement BQ123 et BQ788). La fluorescence du peptide marqué a été quantifiée par cytométrie en flux et les courbes de déplacement, correspondant à la MFI en fonction de la concentration en inhibiteur, ont été tracées avec le logiciel GraphPad Prism. Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) calculées par le logiciel sont reportées dans le tableau.

Ce déplacement de l'ET marquée par l'Ac pourrait également être étudié en microscopie. D'après les résultats de la **figure 40**, une incubation simultanée des CHO-ET_AR avec 100 nM Ac et 10 nM d'ET-1-FAM permettrait d'observer la disparition partielle du marquage membranaire dû au ligand fluorescent. Il serait par ailleurs intéressant de savoir si le déplacement inverse, à savoir l'inhibition de la liaison de l'Ac par l'ET-1, est également vrai.

Des expériences similaires de compétition de liaison entre l'Ac et l'ET-1-FAM (non présentées) ont été réalisées avec les autres IgG anti-ET_AR : ces Ac n'impactent pas la liaison de l'ET-1-FAM. Il semblerait donc que ces Ac soient incapables d'interférer avec la liaison d'ET-1 à ET_AR.

Ces expériences, combinées à l'étude des épitopes reconnus par les anti-ET_AR, apporteraient des informations concernant le site de liaison de l'ET à son récepteur.

Les divergences d'effets observés ici entre le mAb-A1 et les deux autres IgG peuvent être mises en relation avec les B_{MAX} obtenus lors des expériences de saturation ; elles viennent appuyer l'hypothèse d'épitopes différents entre le mAb-A1 et les deux autres IgG.

D. Perspectives

Les Ac dirigés contre ET_AR que nous avons obtenus nécessitent encore un travail de caractérisation important. Au vu des premiers résultats obtenus, quelques axes de recherche peuvent être suggérés.

Tout d'abord, les expériences déjà réalisées, de liaison et de compétition, ont permis de souligner l'importance de l'étude des épitopes reconnus par ces Ac. Une approche de cartographie d'épitope par *pepscan* permettrait, en fonction des résultats, de renforcer les hypothèses qui ont été formulées concernant les sites de fixation des Ac et de l'ET-1. De plus, les expériences de compétition pourraient être précisées en étudiant le déplacement de l'Ac marqué par l'ET-1 et déterminer clairement s'il y a réellement compétition entre ET-1 et le mAb-A1.

Les résultats présentés plus haut mettent en évidence que les trois IgG obtenues ne se comportent pas de la même façon vis à vis du récepteur, puisque seul le mAb-A1 affecte la liaison de l'ET-1 et qu'il ne semble pas occuper le même nombre de sites de liaison que les autres AcM. Le fait que certains des Ac produits n'empêchent pas la liaison de l'ET-1 ne présage cependant pas de leur absence totale d'effet de sur la signalisation du récepteur. Aussi, leur caractérisation devra-t-elle être complétée par une évaluation de leur activité pharmacologique sur l'axe endothéline. D'après les premières expériences qui ont été réalisées au laboratoire, les anti-ET_AR que nous avons obtenus ne semblent pas exercer d'effet inhibiteur sur l'activation des MAPK ERK1/2 par l'ET-1 (**Figure 41**), cependant d'autres voies de signalisation, comme celle de la PLC, doivent également faire l'objet d'investigations, sur lesquelles on ne peut aujourd'hui pas exclure que ces AcM aient un effet antagoniste.

Toutes les perspectives de caractérisation des Ac évoquées ici pourraient également être réalisées sur des lignées humaines cancéreuses surexprimant ET_AR. Dans la mesure où ils reconnaîtraient le récepteur surexprimé à la surface de cellules cancéreuses, même en étant dépourvus d'activité pharmacologique sur ces cellules (compétition avec le ligand naturel, effet sur la signalisation du récepteur), ces AcM, en étant par exemple couplés à des composés chimiques, pourraient être utilisés comme des agents thérapeutiques ou d'imagerie en oncologie. A l'inverse, il faudrait également évaluer la liaison des Ac sur des lignées « saines » surexprimant ET_AR (e. g. cellules musculaires lisses) et étudier leur effet sur la signalisation du récepteur. Cette partie de la caractérisation des Ac est tout aussi importante puisqu'elle pourrait

suggérer des effets secondaires plus ou moins importants lors d'une utilisation *in vivo*.

Dans un second temps, afin de se rapprocher de la liaison des Ac dans un contexte physiologique, ces derniers seraient testés sur des coupes histologiques. Ceci permettrait de plus d'avoir un accès simultané à des tissus sains et cancéreux et d'apprécier qualitativement, en microscopie, la différence de marquage entre le tissu tumoral et le tissu sain. L'utilisation d'explants serait également une approche intéressante afin d'étudier l'impact des anti-ET_AR sur des effets cellulaires bien décrits de l'axe endothéline, tels que la prolifération ou la survie.

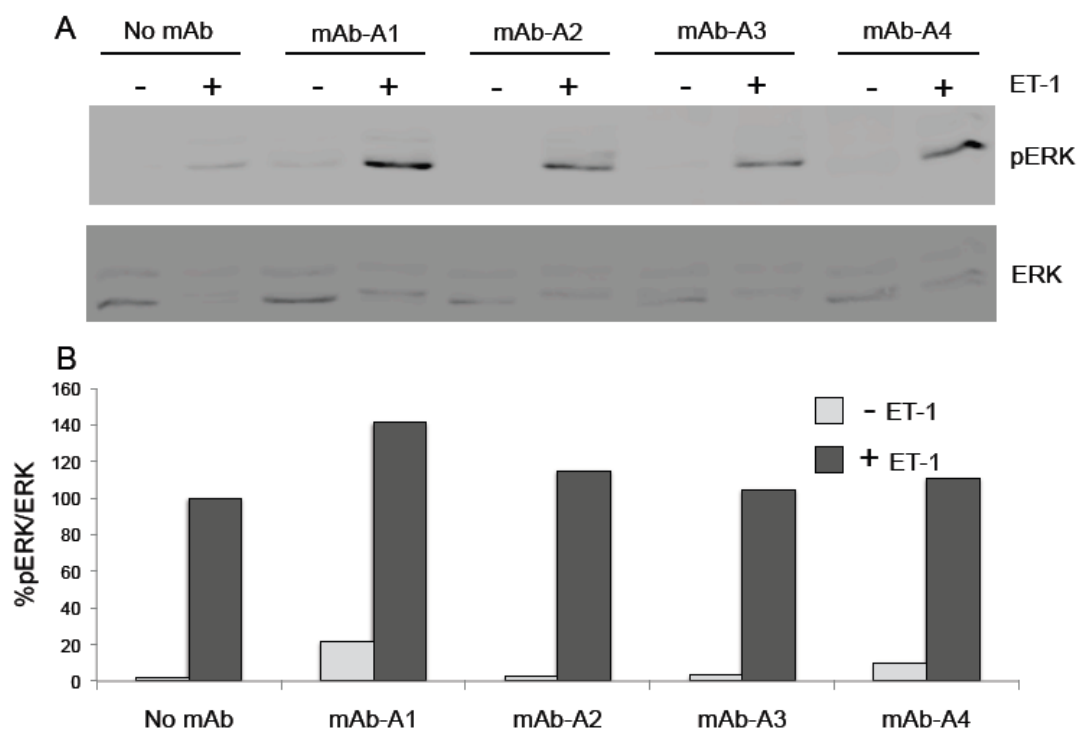


Figure 41. Effet des AcM anti-ET_AR sur l'activation de ERK1/2 par ET-1. Les CHO-ET_AR ont été incubées pendant 2 heures en absence ou en présence de 150 nM d'anti-ET_AR (mAb-A), puis 5 min avec ou sans 50 nM d'ET-1, avant d'être lysées. Les extraits protéiques totaux ont été analysés en western blot. (A) Des Ac dirigés contre les formes actives phosphorylées de ERK1/2 (pERK) et contre la forme totale de ERK2 (ERK) ont été utilisés. (B) Les signaux des protéines phosphorylées et totales ont été révélés simultanément à l'aide d'un scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) et quantifiés. L'intensité du signal mesurée pour les protéines phosphorylées a été rapportée à celle des protéines totales correspondantes, pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage du signal obtenu après stimulation avec ET-1, sans traitement préalable avec un mAb-A.

PARTIE RESULTATS ET_{BR}

A. Le mélanome

1. Epidémiologie du mélanome

Avec une incidence qui progresse plus rapidement que celles de toutes autres tumeurs solides, le mélanome est un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays. En effet on dénombre plus de 200 000 nouveaux cas diagnostiqués par an à travers le monde en 2012 et 55 000 décès dont 1 800 en France. C'est en Australie et en Nouvelle-Zélande que l'incidence et la mortalité sont les plus élevées (Source : GLOBOCAN 2012, Organisation mondiale de la santé).

2. Types de mélanomes

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le mélanome représente 5 à 7% des cancers de la peau, loin derrière le carcinome basocellulaire et le carcinome spinocellulaire (respectivement 80 et 15 à 20% des cancers de la peau). Il existe une classification des mélanomes en fonction de la cause et du site de leur apparition ainsi que de leur gravité⁴⁹⁹ (Source : Haute Autorité de Santé, HAS).

- Le mélanome superficiel extensif ou SSM (pour *superficial spreading melanoma*) est la forme la plus répandue dans les populations caucasiennes (>70%). Touchant des personnes d'une moyenne d'âge de 50 ans, il se localise au niveau de sites exposés au soleil.

- Le mélanome nodulaire, qui se caractérise par un développement rapide, il peut être associé à une ulcération et des saignements et il est généralement diagnostiqué chez des patients d'une moyenne d'âge de 70 ans.

- Le mélanome de Dubreuilh, LMM ou LM (pour *lentigo malignant melanoma* ou *lentigo maligna*, respectivement invasif et *in situ*) touche des patients plus âgés (80 ans en moyenne). On le retrouve au niveau des zones d'exposition chronique au soleil, telles que la tête, le cou et les avant-bras.

- Le mélanome acral-lentigineux ou ALM (pour *acral lentiginous melanoma*) se développe, comme son nom l'indique, au niveau des paumes, de la plante des pieds et sous l'ongle. Cette forme indépendante de la surexposition aux rayonnements ultraviolets (UV) se manifeste le plus souvent chez des personnes dont la peau est marron ou noire.

3. Facteurs de risque du mélanome

Le mélanome est une maladie multifactorielle combinant des facteurs de risque environnementaux, notamment l'exposition au soleil et aux rayonnements UV artificiels, et des facteurs de risque génétiques, spécifiques aux individus.

L'exposition aux UV a été directement incriminée comme facteur de mutagenèse dans le mélanome⁵⁰⁰. La surexposition pourrait être à l'origine de la constante augmentation de l'incidence de ce cancer⁵⁰¹. Dans certains pays cependant on observe une stabilisation récente de l'incidence chez les jeunes adultes, sans doute liée au changement de comportement de la population. Le temps entre l'initiation du cancer et sa détection clinique peut être de plusieurs décennies.

En raison d'une pigmentation peu prononcée de leur peau, les populations caucasiennes présentent un risque plus élevé de développer un cancer de la peau en général, et plus particulièrement un mélanome. En effet, alors que les personnes dont la peau est fortement pigmentée (marron et noire, types de peau V et VI) peuvent généralement tolérer de forts niveaux d'exposition au soleil sans présenter de risque de coup de soleil ou augmenter leur risque de développer un cancer de la peau, les personnes à peaux pâles (tâches de rousseur éventuelles), blondes ou rousses, aux yeux clairs (phototypes I et II), sont des individus à risque pour ce type de cancer. Entre ces deux extrêmes, on considère que les personnes dont la peau et les yeux sont foncés (phototypes III et IV) ont un risque moyen d'être atteintes par un cancer de la peau. L'exposition excessive au soleil n'est cependant pas sans risque, quel que soit le phototype considéré, pour la peau, comme pour les yeux. Parmi les facteurs de risque figurent aussi un nombre élevé de grains de beauté et des antécédents personnels ou familiaux de mélanome (Source : Institut National du Cancer).

On estime que 10% des mélanomes cutanés se développent dans un contexte familial, avec deux proches ou plus atteints de la maladie. Ainsi, l'atteinte de gènes comme *MC1R* (pour *melanocortin 1 receptor*), qui interagirait avec l'exposition au

soleil⁵⁰², présente donc une faible prévalence mais une forte pénétrance. Des mutations dans les gènes *CDKN2A* et *CDK4* (respectivement pour *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* et *cyclin-dependent kinase 4*) sont également décrites dans des formes familiales de mélanome^{503, 504}. Quant à la substitution de bases conduisant à la mutation E318K du gène *MITF* (pour *microphthalmia-associated transcription factor*), elle est associée à une prédisposition génétique au mélanome et/ou à de multiples mélanomes primaires, tout comme à un nombre élevé de naevi^{505, 506}. Les individus porteurs de cette mutation ont un risque plus de 5 fois supérieur de développer ce cancer⁵⁰⁵. La protéine MITF mutée présente un défaut de sumoylation et augmente la capacité migratoire et invasive des cellules^{505, 506}.

4. Progression du mélanome

Les mélanomes peuvent se développer à partir de naevi préexistants, dans 20 à 40% des cas, ou formés *de novo*⁵⁰⁷. La transformation des naevi en mélanome est un processus comprenant différentes étapes (**Figure 42**). Dans un premier temps il existe une phase de croissance dite radiale ou horizontale pendant laquelle les mélanocytes acquièrent des propriétés prolifératives et de survie ; puis une phase de croissance verticale qui consiste en l'invasion du derme et de l'hypoderme par les cellules cancéreuses ; enfin, au stade métastatique, les cellules ont traversé l'endothélium et colonisent des sites éloignés⁵⁰⁸.

Il existe de grandes similitudes entre la progression tumorale et l'embryogenèse, les cellules présentant dans les deux cas de forts potentiels migratoires et prolifératifs. Selon le modèle de Clark (**Figures 42 et 43**), la progression du mélanome est décrite comme un processus linéaire de différenciation anormale de mélanocytes matures⁵¹⁰. Les cellules acquièrent ainsi de façon graduelle des mutations leur conférant des propriétés d'auto-renouvellement et un caractère invasif. Ce modèle est à mettre en opposition avec celui des cellules souches (**Figure 43**) qui propose l'existence de sous-populations tumorales, dont certaines possédant des propriétés de cellules souches, avec une capacité d'auto-renouvellement continu, ce qui favorise l'accumulation de mutations⁵¹¹. En effet, il a été mis en évidence une hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur, certaines cellules présentant des marqueurs de cellules souches. Des expériences *in vivo* ont montré que ces dernières, s'auto-renouvelant et se différenciant en diverses lignées

cellulaires, sont plus tumorigènes que les cellules des autres sous-populations. Ce résultat pointe donc les limites du modèle linéaire initialement envisagé^{510, 511}. Enfin, il existe un modèle dit d'inter-conversion (**Figure 43**) reposant sur la régulation de l'expression de certains gènes en réponse au microenvironnement tumoral^{512, 513}. Les cellules de mélanome passeraient ainsi d'un état prolifératif à un état invasif différencié⁵¹⁴.

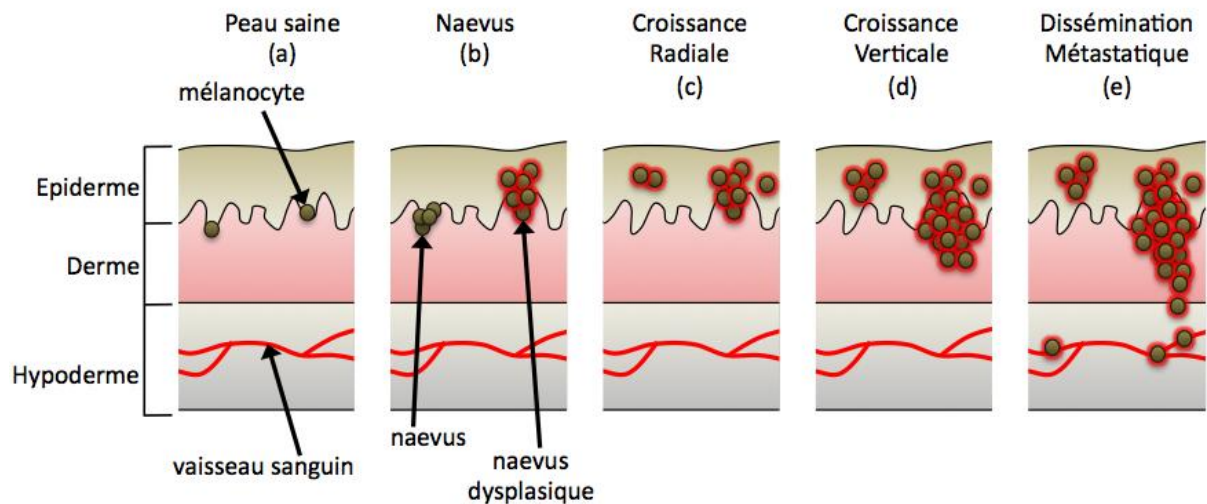


Figure 42. Modèle de développement linéaire du mélanome (modèle de Clark). Le développement et la progression du mélanome à partir d'un mélanocyte sain se décompose en une succession d'étapes. A partir d'une peau saine (a) il y a développement d'un naevus par augmentation du nombre de mélanocytes (b). Certains naevi, morphologiquement atypiques, sont dits dysplasiques. Pour ces naevi s'en suit une phase de croissance radiale intra-épidermique (c) (RGP, *radial growth phase*), avec une propagation pagétoïde histologiquement caractéristique du mélanome, puis une phase de croissance verticale (d) (VGP, *vertical growth phase*) au cours de laquelle il y a une extension de la tumeur au-delà de la membrane basale (invasion du derme). Enfin, les cellules cancéreuses envahissent le tissu sous-cutané et les vaisseaux sanguins et lymphatiques lors de la dissémination métastatique (e). D'après Gray-Schopfer *et al.*, 2007⁵⁰⁹.

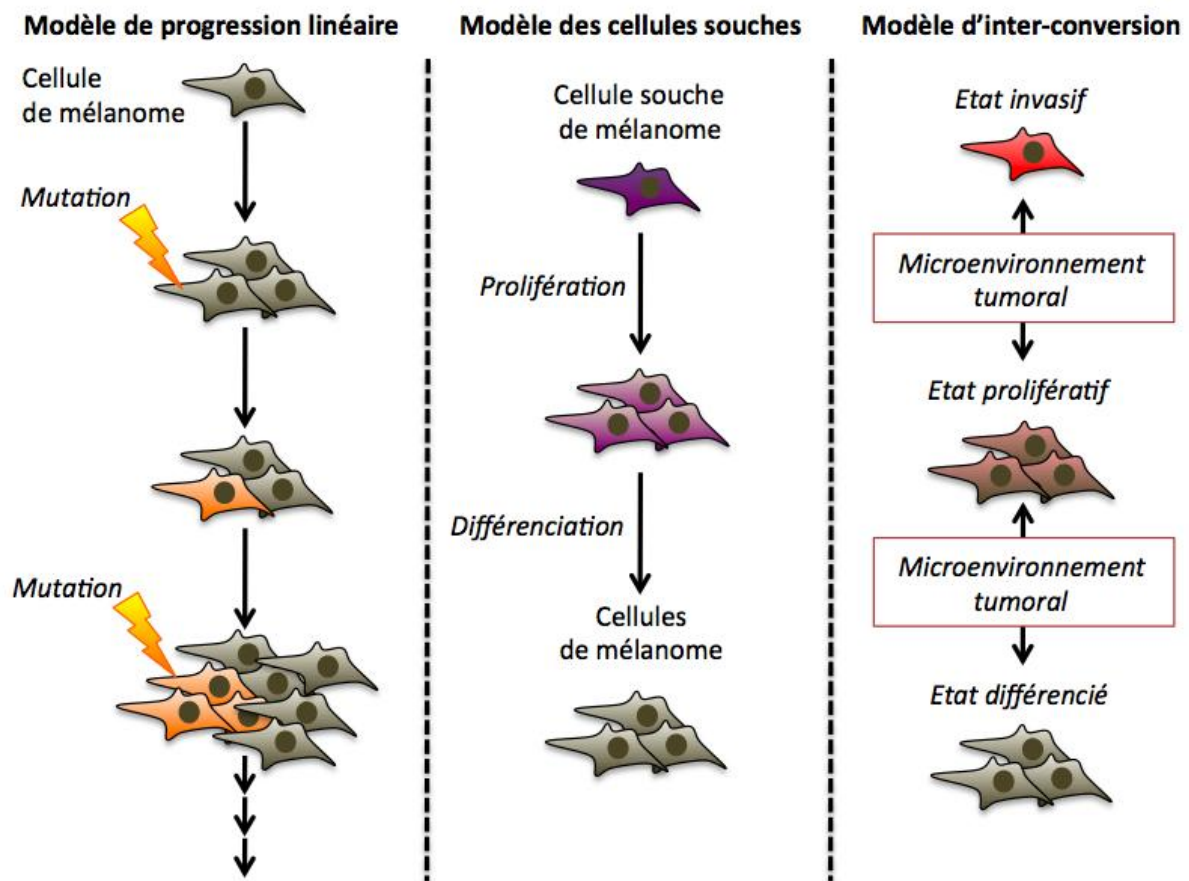


Figure 43. Modèles de progression du mélanome. (a) Modèle de progression linéaire, selon lequel l'instabilité génique et l'expansion clonale permettent le développement du mélanome⁵¹⁰. (b) Modèle des cellules souches cancéreuses qui accorde un pouvoir tumorigène à une sous-population de cellules souches qui selon différentes hypothèses pourraient par exemple dériver de cellules souches adultes ou provenir de la dé-différenciation de cellules somatiques⁵¹⁵. (c) Modèle d'inter-conversion proposant une plasticité phénotypique dépendant des interactions avec le microenvironnement tumoral⁵¹⁴.

5. Les différents stades de développement du mélanome

Le système de classification du mélanome établi par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) et l'*Union for International Cancer Control* (UICC) est basé sur l'évaluation de trois critères : la tumeur primaire (T) (épaisseur de Breslow, ulcération) ; la présence/l'absence de métastases régionales (N) (nombre de ganglions lymphatiques atteints) ; la présence/l'absence de métastases distantes (M) (sites de métastases, mesure des concentrations en lactate déshydrogénase). A partir de ces critères a été mise place une classification des mélanomes en stades. Selon la HAS et l'INCa, elle peut être résumée comme suit (**Figure 44**) :

- stades I et II : mélanome localisé
- stade III : mélanome avec métastases locorégionales cutanées ou ganglionnaires
- stade IV : mélanome avec métastases à distance

Stade	Critères cliniques et pathologiques
0	NA
IA	• Epaisseur de la tumeur ≤ 1 mm, sans ulcération, mitose $< 1/\text{mm}^2$
IB	• Epaisseur de la tumeur ≤ 1 mm, avec ulcération ou mitose $\geq 1/\text{mm}^2$ • $1 \text{ mm} < \text{Epaisseur de la tumeur} \leq 2 \text{ mm}$, sans ulcération
IIA	• $1 \text{ mm} < \text{Epaisseur de la tumeur} \leq 2 \text{ mm}$, avec ulcération • $2 \text{ mm} < \text{Epaisseur de la tumeur} \leq 4 \text{ mm}$, sans ulcération
IIB	• $2 \text{ mm} < \text{Epaisseur de la tumeur} \leq 4 \text{ mm}$, avec ulcération • Epaisseur de la tumeur $> 4 \text{ mm}$, sans ulcération
IIC	• Epaisseur de la tumeur $> 4 \text{ mm}$, avec ulcération
IIIA	• Tumeur sans ulcération, micrométastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques sentinelles
IIIB	• Tumeur avec ulcération, micrométastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques sentinelles • Tumeur sans ulcération, macrométastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques sentinelles ou métastases "en transit"
IIIC	• Tumeur avec ulcération, macrométastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques sentinelles ou métastases "en transit" • Tumeur avec ou sans ulcération, métastase dans 4 ganglions lymphatiques sentinelles ou plus ou métastases "en transit" avec métastase(s) ganglionnaire(s)
IV	• Métastases à distance

Figure 44. Classification de l'AJCC. Le stade clinique inclut différents paramètres : l'épaisseur, l'état d'ulcération et de mitose au sein de la tumeur primaire, ainsi que l'évaluation des métastases. En plus des informations collectées concernant la tumeur primaire, le stade pathologique prend en compte l'étude des ganglions lymphatiques sentinelles, sauf pour les stade 0 et IA. Les micrométastases sont diagnostiquées après biopsie du ganglion sentinelle. Les macrométastases ganglionnaires sont définies comme cliniquement détectables, pathologiquement confirmées. NA : non applicable. D'après Balch *et al.*, 2009⁵¹⁶.

6. Physiopathologie

Les ET comptent parmi les facteurs paracrines cruciaux de la biologie des mélanocytes⁵¹⁷. En effet, l'axe endothéline joue un rôle important durant les étapes précoces et tardives de développement de ces cellules, mais également dans leur réponse au rayonnement UV ou encore, et ce point nous intéresse davantage, dans des conditions pathologique, dont le mélanome.

6. 1. Développement des mélanocytes et axe endothéline

Les mélanocytes forment un groupe hétérogène de cellules dont la propriété commune est la production de mélanine, pigment intervenant dans la protection contre le rayonnement UV⁵¹⁸. On notera que ces cellules ne sont cependant pas les seules à produire ce pigment⁵¹⁷. Elles sont entre autres présentes au niveau de la peau, de l'iris et de l'oreille interne.

Les mélanocytes dérivent des cellules des crêtes neurales (*neural crest cell*, NCC), des cellules embryonnaires à fort potentiel migratoire⁵¹⁹. Les NCC, qui sont à l'origine de nombreux types cellulaires et tissulaires, se différencient dans un premier temps en progéniteurs pluripotents, puis bipotents, avant de se différencier en mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes^{519, 520}. Les mélanocytes nouvellement différenciés mûrissent, c'est à dire qu'ils deviennent capables de produire la mélanine dans des organelles spécialisés, les mélanosomes, et acquièrent une morphologie dendritique⁵²⁰. Dans la peau, ils sont présents au niveau de la lame basale, à la jonction entre l'épiderme et le derme. Un mélanocyte se trouve en relation avec 30 à 40 kératinocytes, formant ainsi une unité épidermique de mélanisation (UEM)⁵²¹ (**Figure 45**). Ils se caractérisent par différents marqueurs tels que la tyrosinase (TYR) et MITF⁵²⁰.

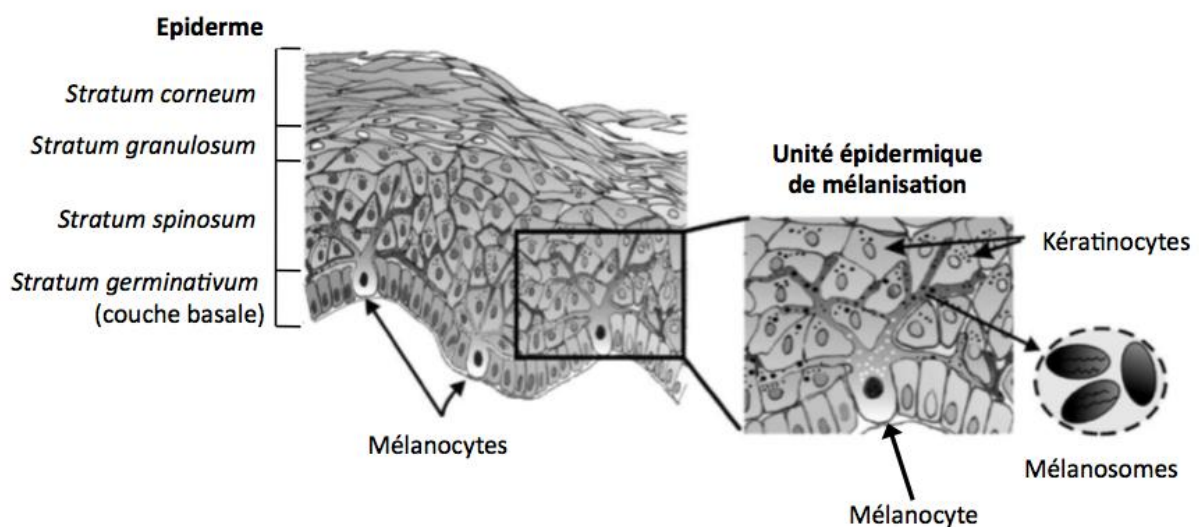


Figure 45. Schéma représentatif de la structure épidermique. Le mélanocyte présent dans la couche basale établit des communications dendritiques avec 30 à 40 kératinocytes, formant une unité épidermique de mélanisation. Le mélanocyte synthétise la mélanine dans des structures appelées mélanosomes, transportées jusqu'aux kératinocytes. Proposé par Cichorek *et al.*, 2013⁵²⁰.

Comme nous l'avons précédemment mentionné dans l'introduction (A. 4. 5.), des modèles de souris invalidées ont permis de mettre en évidence l'importance d'*Edn3* et d'*EDNRB* dans le développement des mélanocytes^{219, 220}. Grâce à un système d'expression inductible, M.K. Shin et ses collaborateurs ont précisé que l'expression d'ET_BR était primordiale au développement des mélanocytes chez la souris⁵²². Plus précisément, le récepteur semble être indispensable à la survie et à la migration des mélanoblastes.

Diverses études ont montré qu'ET-3 promeut la prolifération et l'auto-renouvellement des précurseurs des mélanocytes, dans des modèles aviaire et murin, maintenant également la multipotence. De plus ce peptide est un facteur mitogène, de survie et de différenciation des mélanoblastes⁵²³⁻⁵²⁷. Au contraire, le traitement des mélanocytes par l'ET-3 favoriserait une dé-différenciation, avec une réexpression de marqueurs précoce des NCC⁵²⁸. Les cellules exprimeraient même des marqueurs des cellules gliales, suggérant une trans-différenciation⁵²³.

Le rôle de l'axe ET-3/ET_BR a été mis en évidence dans le processus de différenciation des mélanocytes : alors que l'exposition initiale à ET-3 inhibe la différenciation de NCC, un traitement prolongé se traduit par l'augmentation du nombre de cellules pigmentées, c'est à dire la différenciation des mélanocytes^{525, 526}. Plus précisément, ET_BR serait spécifiquement requis à la différenciation finale des mélanocytes, peut être par le biais de la régulation des enzymes mélanogéniques^{524, 527, 529}.

L'ensemble de ces études attestent de rôle majeur de l'axe endothéline, et plus particulièrement d'ET-3/ET_BR, dans la physiologie des mélanocytes, dans des étapes précoces du développement et également à des stades tardifs de la différenciation⁵¹⁷.

6. 2. Etiologie du mélanome

Différentes mutations ont été identifiées dans le mélanome, dont certaines ayant un impact sur l'agressivité du cancer, constituant ainsi des cibles thérapeutiques privilégiées⁵³⁰. Selon une étude récente menée sur 132 patients et 291 tumeurs, 58% des mélanomes primaires étudiés étaient porteurs de mutation dans les gènes *BRAF* et *NRAS* (43% et 15% de mutations respectivement). Ces mutations activatrices, qui jouent un rôle clé dans la prolifération et la survie du mélanome, via l'activation de la

voie MAPK⁵³¹, sont également présentes dans les métastases, sans augmentation significative de leur fréquence. La distribution des mutations *BRAF/NRAS* n'est cependant pas forcément conservée d'un site de métastase à l'autre, suggérant la génération de sous-clones chez certains patients⁵³⁰. 90% des mutations du gène *BRAF* sont localisées dans l'exon 15 au niveau de la valine 600. La plupart d'entre elles consistent en un échange de la valine en glutamate (*BRAF* V600E, environ 70% des cas), bien qu'il puisse également s'agir d'une substitution en lysine (*BRAF* V600K, environ 20% des cas)⁵³². La mutation *BRAF* V600E serait d'avantage associée à une exposition intermittente au soleil, qu'à une exposition continue. Il a été montré que les souris transgéniques porteuses de la mutation *BRAF* V600E développaient des mélanomes de façon spontanée⁵³³.

D'autres mutations, responsables du caractère invasif du mélanome, ont été identifiées. Par exemple, il existe des mutations dans le gène *KIT*, dont la fréquence est plus importante dans les mélanomes acro-lentigineux et muqueux⁵³⁴.

Les cellules de mélanome partagent de nombreuses caractéristiques avec les précurseurs des mélanocytes. Les approches d'inactivation de gènes, les essais cellulaires et les observations immunohistochimiques sont autant de techniques qui ont permis de mettre en évidence l'existence de gènes (e.g. protéines SOX, MITF) et de voies de signalisation (e.g. Notch, Wnt) impliqués à la fois dans la spécification et la maintenance des mélanocytes, mais aussi dans la formation et la progression du mélanome⁵¹⁹. Nous nous intéressons plus particulièrement ici au parallèle qui peut être fait entre les effets physiologiques de l'axe endothéline (plus particulièrement ET-3/ET_BR) sur les mélanoblastes et son action sur la progression du mélanome.

Si une diminution de l'expression d'ET_BR a été rapportée pour certaines lignées de mélanomes⁵³⁵, pour la majorité d'entre elles, il a été observé une surexpression du récepteur^{315, 536, 537}. Parce qu'il est davantage exprimé dans le mélanome métastatique que dans la tumeur primaire⁵³⁸, ET_BR est considéré comme un marqueur de progression de la maladie. De plus, certaines mutations d'*EDNBR* seraient impliquées dans la prédisposition au mélanome⁵³⁹. Parallèlement à cela, il a été mis en évidence une expression aberrante d'ET-3 dans les cellules métastatiques de mélanome, promouvant la survie des cellules⁵⁴⁰. De plus, ET-3 exerce un effet prolifératif sur les cellules de mélanome, et ce de manière dose-dépendante²⁷². En effet, l'inhibition de l'expression d'ET-3 entraîne l'inhibition de la prolifération, de l'invasion et de la survie du mélanome⁵⁴¹.

Des expériences *in vivo* ont montré un effet combinatoire des UVB avec l'expression d'ET-3, Kitl (pour *kit-ligand*) et bFGF (pour *basic fibroblast growth factor*), induisant le développement de lésions pigmentées, histologiquement caractérisées comme des mélanomes. Les UVB, ET-3, Kitl et bFGF exerceraient un effet synergique sur les mélanocytes⁵¹⁷.

Les effets de l'axe endothéline sur la progression du mélanome cités ci-dessous ne font pas figure de liste exhaustive mais uniquement d'exemples, un chapitre ayant été consacré à ces effets dans l'introduction (B. 2.). Dans le mélanome cutané, ET-1 et ET-3, via ET_BR, induisent une diminution de l'expression du système de molécules d'adhésion l'E-cadhérine-caténine, alors qu'au contraire elles augmentent l'expression de la N-cadhérine²⁵⁸. Ce changement de profil d'expression, de l'isoforme E à l'isoforme N, est décrit comme un mécanisme libérant les mélanomes du contrôle des kératinocytes et changeant les propriétés migratoires des cellules, favorisant ainsi la progression tumorale⁵⁴². Par ailleurs, les ET affectent les communications intercellulaires en phosphorylant la connexine 43 et induisent l'expression du facteur de transcription HIF-1 α , ce qui conduit à la l'expression du VEGF²⁵⁸.

Différentes études confirment, par l'utilisation du BQ788 ou d'ARN interférants, l'implication d'ET_BR dans le caractère invasif du mélanome, inhibant ainsi sa progression^{71, 259, 543}. Par ailleurs, le bosentan (antagoniste non sélectif ET_A/ET_B) a montré des résultats positifs en essais pré-cliniques qui ont encouragé le développement d'essais cliniques, dont les résultats mitigés ont été décrits dans l'introduction (B. 3. 2.)³⁵⁷.

7. Les traitements du mélanome

Si le pronostique de survie des patients atteints de mélanome à un stade précoce est de 90%, l'exérèse de la tumeur permettant généralement d'éradiquer le cancer, un mélanome avancé (métastatique) est de très mauvais pronostique. Dans ce cas, les stratégies thérapeutiques mises en place sont bien souvent plus palliatives que curatives (**Figure 46**).

Le processus métastatique est communément décrit comme la migration de cellules tumorales individuelles détachées de la tumeur primaire qui entrent dans la circulation lymphatique ou dans la circulation sanguine (intravasation). Suite à leur

liaison aux cellules endothéliales et à leur extravasation des vaisseaux, les cellules cancéreuses s'établissent dans un organe et y prolifèrent.

Dès lors que le mélanome a développé des métastases à distance de la tumeur primaire il est quasiment incurable : la médiane de survie des patients est réduite à 6-9 mois, la survie à 1 an est de 25% et celle à 3 ans n'excède pas 15%^{516, 544}.

Stade	Chirurgie	Curage ganglionnaire	Immunothérapie	Chimiothérapie	Radiothérapie
I	✕				
II	✕		✓		
III*	✕	✕	✓		✓
IV	✓	✓	✓	✓	✓

✕ : approche thérapeutique de référence

✓ : approche thérapeutique envisageable, à discuter

* : stade III inopérable équivaut au stade IV

Figure 46. Stratégies thérapeutiques adoptées en fonction du stade du mélanome. Proposé par la Haute Autorité de Santé et l'Institut National du Cancer, 2012.

L'indentification de molécules clés impliquées dans la pathogénicité du mélanome a conduit au développement de nouvelles thérapies ciblées. En effet, comme expliqué plus haut, dans de nombreux cas de mélanomes il existe une activation constitutive ou une dérégulation des voies de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK (voie MAPK), PI3K/AKT/mTOR (voie AKT) qui ont pour conséquence de favoriser la progression du cancer⁵⁴⁵.

Les inhibiteurs actuellement à disposition pour traiter les patients sont résumés dans la **figure 47**. Ils ciblent les différents acteurs des voies MAPK et AKT. Les deux voies RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR sont connues pour interagir à différents niveaux, ce qui aboutit à des activations et des inhibitions croisées, faisant de ces nœuds signalétiques (**Figure 48**) une cible privilégiée pour la thérapie⁵⁴⁶.

Médicament	Cible	Voie de signalisation
Sorafenib (BAY43-9006)	<i>B-RAF, C-RAF, VEGF-R, PDGF-R</i>	Ras/Raf/MEK/ERK
Vemurafenib (PLX-4032)	<i>B-RAF(V600E, V600K)</i>	
Dabrafenib (GSK 2118436)	<i>B-RAF(V600E, V600K)</i>	
Trametinib (GSK1120212)	MEK1/2	
Selumetinib (AZD6244)	MEK1/2	
BEZ235	PI3K-mTOR	PI3K/AKT/mTOR
GSK2126458	PI3K-mTOR	
BYL719	PI3K	
CCI-779 (Temozolimus)	mTORC1	
RAD001 (Everolimus)	mTORC1	
Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Récepteur CTLA-4

Figure 47. Inhibiteurs des voies de signalisation utilisés dans le traitement du mélanome et leurs cibles d'action. Proposé par Russo *et al.*, 2014⁵⁴⁵.

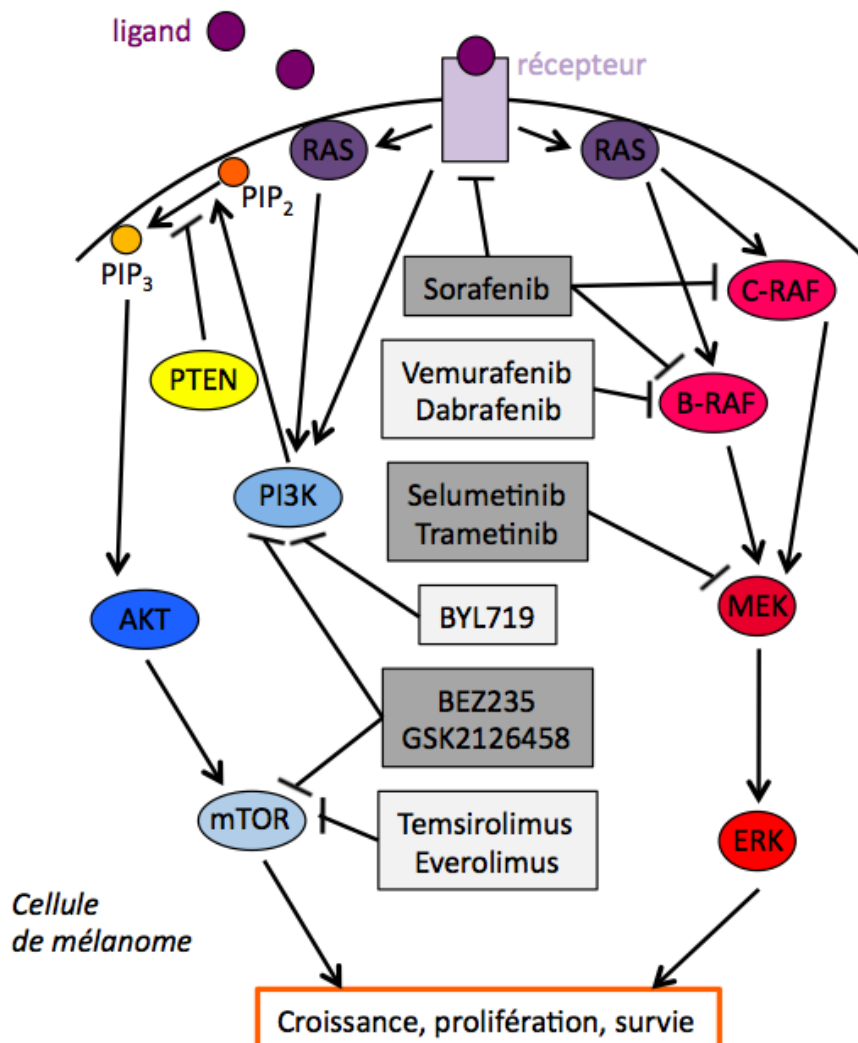


Figure 48. Voies de signalisation PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK et mécanismes d'action de leurs inhibiteurs dans le mélanome. D'après Russo *et al.*, 2014⁵⁴⁵.

La première immunothérapie approuvée par la FDA pour le mélanome métastatique est un traitement à l'interleukine-2 (IL-2), dont l'efficacité est malheureusement faible⁵⁴⁵.

Dans le cas du mélanome, les lésions cancéreuses contiennent souvent un nombre important de lymphocytes T infiltrants, spécifiques des Ag associés à la tumeur⁵⁴⁷. Une approche thérapeutique consiste à augmenter l'activité de ces L_T cytotoxiques. Comme il a été expliqué dans l'introduction (C. 6. 1.), le CTLA-4 constitue un « *checkpoint* » immunitaire impliqué dans l'inhibition de l'activation des cellules T. De ce fait, cette protéine de type immunoglobuline, présente à la surface des L_T CD4+, CD8+ et régulateurs, est une barrière contre l'autoimmunité mais aussi une cible immunitaire (**Figure 49**).

L'ipilimumab est un AcM humain recombinant qui se lie au CTLA-4, empêchant ainsi la liaison de ses ligands, le CD80 et le CD86 (**Figure 49**). Il en résulte une prolifération incontrôlée des cellules T, ce qui augmente la réponse anti-tumorale de ces cellules mais également les risques d'émergence de phénomènes auto-immuns⁵⁴⁸.

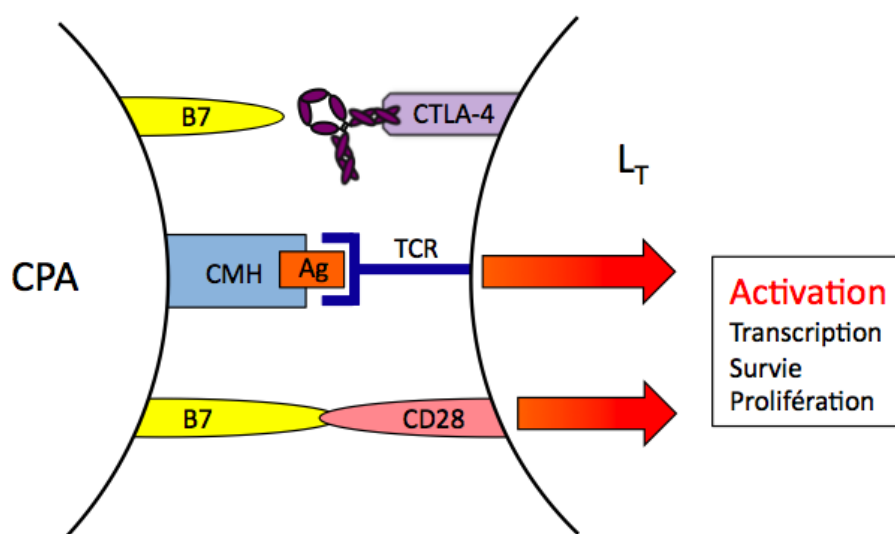


Figure 49. Mécanisme d'action de l'ipilimumab. L'antigène (Ag) présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présent à la surface de la cellule présentatrice de l'Ag (CPA) est reconnu par le TCR (*T cell receptor*, récepteur des cellules T) présent à la surface du lymphocyte T (L_T). Le cosignal induit par l'interaction entre la protéine B7 et le CTLA-4 (pour *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) exerce une régulation négative du système immunitaire. La liaison de l'ipilimumab au CTLA-4 abolit cette interaction, favorisant la co-signalisation activatrice du L_T, médiée par l'interaction de B7 et du CD28. D'après Luke et Hodi, 2013⁵⁴⁹.

L'ipilimumab, après avoir montré son rôle déterminant dans l'augmentation significative de la survie globale des patients atteints de mélanome de stade IV³⁸¹, a été accepté comme monothérapie par la FDA et l'EMA à partir de 2011. Cet AcM a ainsi été le premier traitement efficace du mélanome non résecable ou métastatique en 13 ans^{410, 545}.

Fonctionnant sur le même principe d'activation du système immunitaire contre la cellule cancéreuse, le pembrolizumab et le nivolumab, tout récemment acceptés par la FDA (4 septembre 2014 et 22 décembre 2014, respectivement), sont également utilisés comme traitement du mélanome⁵⁴⁵ ; ils exercent leur action en ciblant le récepteur inhibiteur des cellules T PD-1 (pour *programmed cell death 1*), empêchant la liaison de son ligand PD-L1.

En résumé, il existe actuellement deux types d'approches offrant des résultats encourageants en termes d'amélioration de la survie des patients atteints de mélanome métastatique : l'immunomodulation, reposant sur l'utilisation d'un Ac anti-CTLA-4, et la thérapie ciblée, mettant en jeu des inhibiteurs de BRAF et de MEK, dans le cas des mélanomes présentant une mutation de ces kinases^{410, 550}. Alors que l'anti-CTLA-4 induit des réponses à long terme chez un nombre réduit de patients, les thérapies ciblées fonctionnent pour nombre de malades, bien qu'une rechute soit observée chez la plupart des patients en raison de résistances pré-existantes ou acquises. Actuellement les pistes de recherche privilégiées sont : la détermination des marqueurs biologiques et cliniques permettant de mesurer l'efficacité de l'anti-CTLA-4 ; la détermination et le contournement des mécanismes de résistance des thérapies ciblées. Pour répondre à ce deuxième point, la thérapie combinatoire représente un axe considérable de recherche⁵⁴⁵. Actuellement, on dénombre plus de 280 essais cliniques portant sur le mélanome de stade IV, évaluant notamment les bénéfices de nouvelles thérapies combinatoires⁵⁴⁵.

L'agressivité du mélanome et le mauvais pronostic vital associé à sa métastase, en dépit des nombreux traitements aujourd'hui à disposition du corps médical, plaident en faveur du développement de nouvelles thérapies mettant en jeu des cibles spécifiques et dont le potentiel n'est pas encore exploité en cancérologie. C'est le cas des récepteurs des ET. Le fait qu'ET_BR soit surexprimé dans le mélanome et qu'il contribue à la progression métastatique du mélanome au niveau du système nerveux central²⁹⁹, manifestation associée à un mauvais pronostic, constitue un argument supplémentaire en faveur du développement de molécules ciblant ce récepteur.

B. Choix d'un AcM ciblant ET_BR : du rendomab-B1 au rendomab-B4

L'implication de l'axe endothéline dans la progression tumorale est aujourd'hui largement admise. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence, d'une part la surexpression d'ET_AR et/ou d'ET_BR, et d'autre part l'expression de leurs ligands, dans un large panel de tumeurs et de lignées cancéreuses^{252, 254, 255, 258, 259, 267, 278}. Par ailleurs, il a été montré que l'activation des récepteurs des ET présents au sein de la tumeur, à la surface des cellules tumorales elles-mêmes ou à la surface des cellules du microenvironnement tumoral, participait à des processus cellulaires variés (comme détaillé dans l'introduction : prolifération, survie, migration, angiogenèse...)²⁷⁸, ces fonctions favorisant l'agressivité du cancer. Plus particulièrement, dans le cas du mélanome, c'est l'axe ET-3/ET_BR qui est mis en cause^{258, 259}. Or il existe un véritable enjeu autour de la mise au point de nouveaux traitements utilisables chez les patients atteints de mélanome métastatique, puisqu'à ce stade avancé de la maladie le pronostique de survie est extrêmement mauvais⁵¹⁶. Du fait de sa surexpression dans les cellules de mélanome^{315, 536, 537}, ET_BR permet un ciblage spécifique des cellules cancéreuses au sein de l'organisme. De plus, l'intérêt d'antagoniser ce récepteur sur le ralentissement de la progression tumorale a déjà été montré^{71, 345, 543}. Ces deux aspects valident donc le choix d'ET_BR comme cible tumorale.

Parce qu'ils présentent une grande spécificité pour leur cible et peuvent exercer un effet antagoniste sur un récepteur, les AcM sont ici des molécules thérapeutiques de choix.

Dans le but d'obtenir des Ac dirigés contre la conformation native d'ET_BR, un protocole d'immunisation génique, combinant des injections de plasmide codant pour le récepteur humain ET_BR et des rappels cellulaires de HEK-293-T surexprimant ce récepteur⁴⁹⁵, a été développé. A l'issue d'une fusion cellulaire entre les cellules sécrétrices d'Ac des souris ayant le mieux répondu à l'immunisation et des cellules de myélome murin, un ensemble d'AcM dirigés contre ET_BR humain a été obtenu. 24 Ac retenus ont été sélectionnés sur un critère de reconnaissance spécifique d'ET_BR surexprimé à la surface des cellules CHO (CHO-ET_BR). C'est donc naturellement que le premier Ac sélectionné pour une caractérisation approfondie a été celui exerçant le plus grand effet antagoniste sur le récepteur (compétition avec le ligand et inhibition

de la signalisation calcique) : le rendomab-B1, dont j'ai contribué à l'étude⁴⁶⁶. Cependant, alors que le rendomab-B1 se lie à ET_BR exprimé à la surface de cellules endothéliales (HUVEC), il est incapable de lier le récepteur exprimé à la surface de différentes lignées de mélanomes. Ce résultat inattendu, montrant une liaison différentielle du rendomab-B1 entre le récepteur exprimé par les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses, suggère l'existence d'une forme « saine » et d'une forme « tumorale » de récepteur. Le rendomab-B1 ciblerait spécifiquement les vaisseaux, donc le stroma tumoral, et pourrait de ce fait impacter l'angiogenèse. On imagine aisément qu'à l'inverse il puisse exister, parmi les 24 AcM sélectionnés, des Ac ne se fixant pas sur ET_BR exprimé par les cellules endothéliales, mais reconnaissant spécifiquement le récepteur exprimé par les cellules tumorales. C'est à partir de cette hypothèse qu'un nouvel anti-ET_BR a été sélectionné : le rendomab-B4, dont la caractérisation fait partie de mon travail de thèse.

C. Article

Rendomab-B4, a monoclonal antibody which discriminates the human endothelin B receptor of melanoma cells and inhibits their migration.

Aurélie Borrull^{1,3}, Anne Wijkhuisen^{1,2}, Amaury Herbert¹, Patricia Lamourette⁴, Wided Birouk³, Denis Leiber³, Zahra Tanfin³, Frédéric Ducancel¹, Didier Boquet^{1\$}, Philippe Robin^{3*}
Jean-Yves Couraud^{1,2*}

1 CEA, iBiTec-S/SPI, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé, 91191 Gif sur Yvette Cedex, France

2 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, EA 3515, 91191 Gif sur Yvette Cedex, France

3 Université Paris Sud-11, CNRS, UMR 8619, IBBMC, 91400 Orsay, France

4 CEA, iBiTec-S/SPI, Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse, 91191 Gif sur Yvette Cedex, France

*The authors are joint last authors

\$ Corresponding author: didier.boquet Email: didier.boquet@cea.fr

ABSTRACT

Metastatic melanoma is an aggressive cancer with a poor prognosis and the design of new targeted drugs to treat the melanoma is a therapeutic challenge. A promising approach is to produce antibodies against the endothelin B receptor (ET_BR) known to be overexpressed in melanoma and to contribute to proliferation, migration and vasculogenic mimicry associated with invasiveness of this cancer.

We previously characterized a monoclonal antibody (rendomab-B1) produced by DNA immunization, with remarkable characteristics in term of affinity, specificity and antagonist properties against human ET_BR expressed by the endothelial cells. Surprisingly, this antibody recognizes ET_BR present at the surface of melanoma cells with a poor affinity. So, we previously concluded that this characteristic strongly suggested the existence of a tumor-specific ET_BR form. The aim of the present study was to characterize a new anti-ET_BR mAb, rendomab-B4, able to recognize specifically and with high affinity the ET_BR expressed at the surface of various melanoma cells. The results show that, rendomab-B4 binds ET_BR expressed on UACC-257, WM-266-4 and SLM8 melanoma cells but not ET_BR expressed on HUVEC cells. Moreover, after binding to UACC-257 cells, rendomab-B4 is internalized and colocalizes with the endosomal protein EEA-1. Interestingly, rendomab-B4, despite its inability to compete with endothelin binding, is able to inhibit phospholipase C pathway and migration induced by endothelin. By contrast, rendomab-B4 fails to decrease ERK1/2 phosphorylation induced by endothelin, possibly suggesting a biased effect on ET_BR.

These data provide evidence that rendomab-B4 can be considered as a promising molecular tool not only for diagnosis, using ET_BR as a molecular marker of melanoma cells, but also for therapy, reducing the invasiveness of melanoma through inhibition of migration.

Keywords: Endothelin, endothelin B receptor, melanoma, monoclonal antibody, cancer, migration, phospholipase C.

INTRODUCTION

Endothelins (ETs) constitute a family of three 21-amino acid peptides ET-1, ET-2 and ET-3, which bind to two distinct 7 transmembrane domain receptors ET_A and ET_B belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family. The endothelin axis (endothelins and their receptors) is strongly involved in physiological and pathological processes. ET-1 plays a crucial role in the regulation of physiological smooth muscle motility¹⁻³ but ET-1 is also implicated in a large variety of pathologies including hypertension, heart failure, kidney disorders and infectious diseases.⁴⁻⁶ In addition, ET axis is overexpressed in cancer of different organs contributing to tumor growth by acting on cell proliferation, survival, migration, differentiation, angiogenesis and inflammatory cell recruitment.^{7, 8} ET_AR are upregulated in prostate,⁹ ovary¹⁰ and breast cancers while ET_BR is overexpressed in melanoma.¹¹⁻¹³

Melanoma is an aggressive cancer that presents an increased incidence rate.¹⁴ This cancer is characterized by its capacity to metastasize promptly thereby subsequent increase in mortality rates in many countries including in Europe.¹⁵ Somatic mutations have been found in BRAF and N-RAS genes in respectively about 50% and 20% of melanomas, resulting in constitutive activation of ERK1/2 MAPK pathway.¹⁶ Moreover, gene expression profiling and targeted approaches have demonstrated that ET_BR expression is upregulated in melanoma.^{12, 17} The upregulation of ET_BR is involved in proliferation, migration and angiogenesis associated with tumor growth and invasiveness. In melanoma, ET-1 via ET_BR expressed on cancer cells modulates migration and formation of vasculogenic mimicry via the upregulation of HIF/VEGF/VEGFR pathway.¹⁸ These data implicate ET_BR as a potential driver of melanoma progression and an important marker of aggressive phenotype.^{7, 12}

ET_BR specific peptidic antagonist (BQ788) has been used in basic research to reduce the proliferation of cancer cells.^{19, 20} Preclinical trial confirmed the efficacy of BQ788 on melanoma growth.²¹ However, bosentan used as a monotherapy has a low effect on

melanoma progression ²² and has no additional effect when combined with a chemotherapeutic agent (dacarbazine). ²³

Therefore, the development of new therapeutic molecules targeting ET_BR is needed to block the upregulated signaling pathways that occur in melanoma.

More recently, the strategy of therapeutic monoclonal antibodies emerged as a very attractive alternative to conventional cancer treatment. Indeed, compared to the small pharmacological molecules, monoclonal antibodies are capable of taking advantage of detecting fine antigenic differences between normal and pathologic cells inhibiting different functions involved in cell growth, migration, angiogenesis or metastasis. Moreover, monoclonal antibodies display various cytotoxic actions through the immune system and can be coupled to several imaging tracers and markers or cytotoxic molecules. Therefore, monoclonal antibody strategy has already been accepted as a promising way to treat cancer. Indeed, trastuzumab, a monoclonal antibody directed against the growth factor receptor HER2 often overexpressed in breast cancer, improves significantly the overall survival of HER2-positive patients. ²⁴ Like HER2 in breast cancer, ET_BR, overexpressed in melanoma, can be targeted by monoclonal antibodies. Based on ET_BR rapid ligand-mediated internalization, anti ET_BR antibodies that would be co-internalized would represent a useful tool to carry cytotoxic drugs inducing cancer cell death. Our group ²⁵ and others ¹⁷ have recently developed monoclonal antibodies directed against ET_BR. The monoclonal antibody developed by Asundi et al. ¹⁷ binds the N-terminal tail of ET_BR but is unable to inhibit ET_BR signaling pathways and associated functions. By contrast, this antibody is endowed with a capacity to rapidly internalize ET_BR and represents a highly efficacious antibody-Drug Conjugate to target ET_BR for melanoma treatment. ¹⁷ At the same time, our group produced rendomab-B1, ²⁵ a monoclonal antibody, which specifically recognizes human ET_BR. This antibody is a strong antagonist and inhibits ET_BR functions in endothelial cells. However, rendomab-B1 does not bind to melanoma ET_BR, suggesting that specific melanoma conformation of ET_BR might exist.

In the present work, using genetic immunization, an original approach to produce antibodies against the tridimensional conformations of membrane receptors, we have obtained a large panel of new monoclonal antibodies directed against the different forms of ET_BR expressed on normal and/or cancer cells. One of them, rendomab-B4, is particularly interesting because this monoclonal antibody is able to specifically recognize melanoma ET_BR with a high affinity, to induce its internalization and to inhibit ET_BR-mediated migration in cancer cells.

RESULTS

Generation and characterization of anti-human ET_BR specific monoclonal antibodies.

As described previously, rendomab-B1 was initially selected based on its unique property to behave as a remarkably potent antagonist of human ET_BR. However this mAb displayed a very low affinity for ET_BR on tumor cells, which prompted us to look for the potential presence, among the 23 other anti-ET_BR mAbs that we produced, of antibodies that could recognize the tumor-associated form of human ET_BR. Towards that aim, binding properties of all the mAbs on CHO-ET_BR and different melanoma cell lines were systematically investigated. Data summarized in **Figure 1A**, show that all the antibodies tested bound to CHO-ET_BR, which was expected since this cell line was used for the screening of the anti-ET_BR expressing hybridomas. However, totally unexpectedly, the mAbs displayed differential properties when assayed on melanoma cells, which allowed us to classify the mAbs into different property groups. For example, the mAbs belonging to group F, such as rendomab-B1 (group F, **Fig. 1A**), were unable to specifically bind to melanoma ET_BR in any cell line. Conversely, the nine mAbs belonging to group A not only recognized ET_BR expressed in CHO, but also the receptor expressed at the surface of the three melanoma cell lines tested, UACC-257, WM-266-4 and SLM8. Based on this specific recognition of ET_BR on melanoma membrane, the mAbs of the group A were selected for further investigations. Among these nine mAbs, mAb number 4, which will be called rendomab-B4, displayed the highest maximal binding (B_{max}) on CHO-ET_BR (**Fig. 1B**). Moreover, as illustrated in **Figure 1C**, the apparent binding affinity (1/EC₅₀, 6.5 nM⁻¹) of rendomab-B4 on CHO-ET_BR was also the highest of the group. No correlation was observed between the isotypic class of the mAb, B_{max}, and affinity. According to these findings, rendomab-B4 was selected for additional studies aiming at characterizing its functional properties.

A

Group: <i>mAb</i> number	CHO-ET _B R	UACC-257	WM-266-4	SLM8
A: 4, 9, 15, 36, 39, 41, 47, 49, 50	+	+	+	+
B: 32, 54, 58	+	+	+	-
C: 8, 38	+	+	-	+
D: 21, 28	+	-	-	+
E: 18, 31, 35	+	+	-	-
F: 1, 17, 22, 44, 45	+	-	-	-

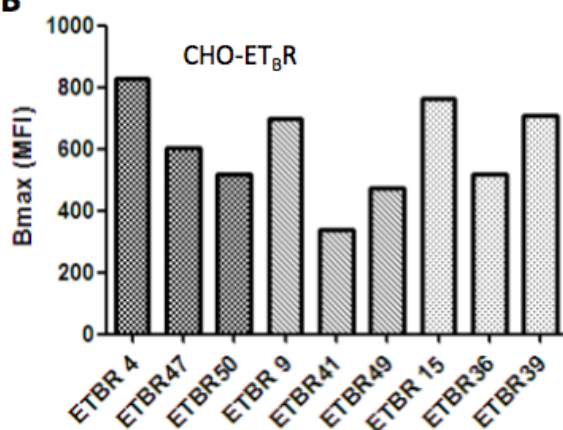
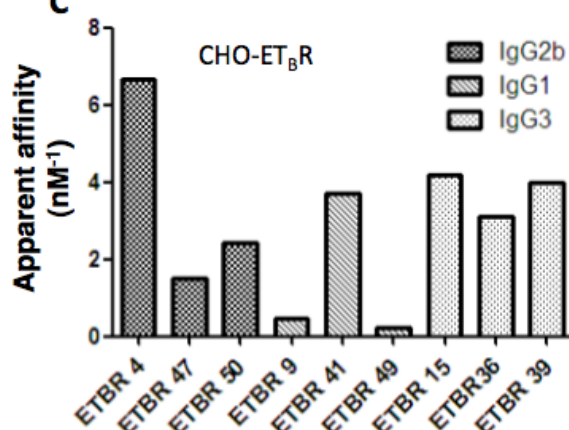
B**C**

Figure 1. Characterization of anti-human ET_BR specific monoclonal antibodies.

(A) Antibodies were classified in different groups according to their binding properties on CHO-ET_BR and melanoma cell lines (UACC-257, WM-266-4 and SLM8). To evaluate maximal binding (B) and affinity (C), CHO cells expressing hET_BR were incubated for 24 h at 4 °C with increasing concentrations of ET_BR directed antibodies. Binding of anti-ET_BR antibodies were revealed using R-PE-labeled anti-mouse antibody and quantified by flow cytometry. Each antibody's maximal binding (Bmax) and apparent affinity (1/EC₅₀) were determined using GraphPad Prism software. Absence of binding (-) refers to an EC₅₀ impossible to measure under our experimental conditions.

Rendomab-B4 specifically recognizes with high affinity human ET_BR overexpressed in CHO cell line

It is well established that the three ETs bind ET_BR with comparable affinities. First, we checked the binding properties of ETs on CHO cells stably transfected with human ET_BR (CHO-ET_BR) by using fluorescent ET-1 and ET-3 (ET-1-FAM and ET-3-FAM respectively).

Flow cytometry experiments show that the two labeled ETs bound to CHO-ET_BR with the same affinity, around 1 nM, and the maximal binding was obtained at 100 nM for the two ligands (**Fig. 2A, B**). Data presented in **Figure 2C** show that rendomab-B4 binding was dose-dependent, saturable, and reached a plateau for a 50 nM concentration (**Fig. 2C**). Half maximal binding (EC₅₀) was about 0.18 ± 0.03 nM (mean \pm s.d), reflecting the high affinity of rendomab-B4 for hET_BR. Additional experiments show that rendomab-B4 bound neither to untransfected CHO cells that do not express ET_BR, nor to rat leiomyoma cell line (ELT-3) that endogenously expressed ET_BR at high level ²⁶ and did not cross-react with ET_AR expressed in CHO cells (data not shown). Altogether, these data indicated that rendomab-B4 was specific to human ET_BR. This specific binding of rendomab-B4 to ET_BR was visualized by immunofluorescence experiments showing that the monoclonal antibody displayed a marked membrane labeling in CHO-ET_BR cells, but not on control untransfected cells (**Fig. 2D**).

Rendomab-B4 does not compete with ET-1 and ET-3 for binding on CHO-ET_BR

Competition experiments were performed to characterize the interaction of rendomab-B4 with ET_BR expressed in CHO in the presence of ET-1-FAM or ET-3-FAM. Data depicted in **Figure 3** show that ET-1 and ET-3, respectively, displaced ET-1-FAM (**Fig. 3A**) and ET-3-FAM (**Fig. 3B**) with IC₅₀ estimated at 0.17 ± 0.07 and 0.31 ± 0.01 nM, respectively. The specific ET_AR antagonist BQ123 failed to reduce ET-1-FAM and ET-3-FAM binding in CHO-ET_BR. By contrast, BQ788, the specific antagonist for ET_BR, displaced ET-1-FAM and ET-3-FAM binding in a dose-dependent manner with IC₅₀ values around 25.2 ± 2.8 and 8.9 ± 4.0 nM, respectively. In contrast, rendomab-B4, and its corresponding isotype control mAb, failed to impair the binding of ET-1-FAM (**Fig. 3A**) and ET-3-FAM (**Fig. 3B**). Conversely, rendomab-B4 binding was not displaced by ET-1, ET-3 and random control peptide (**Fig. 3C**). These data demonstrated that rendomab-B4 and ETs are not competing for receptor binding, suggesting that their binding sites on ET_BR are distinct.

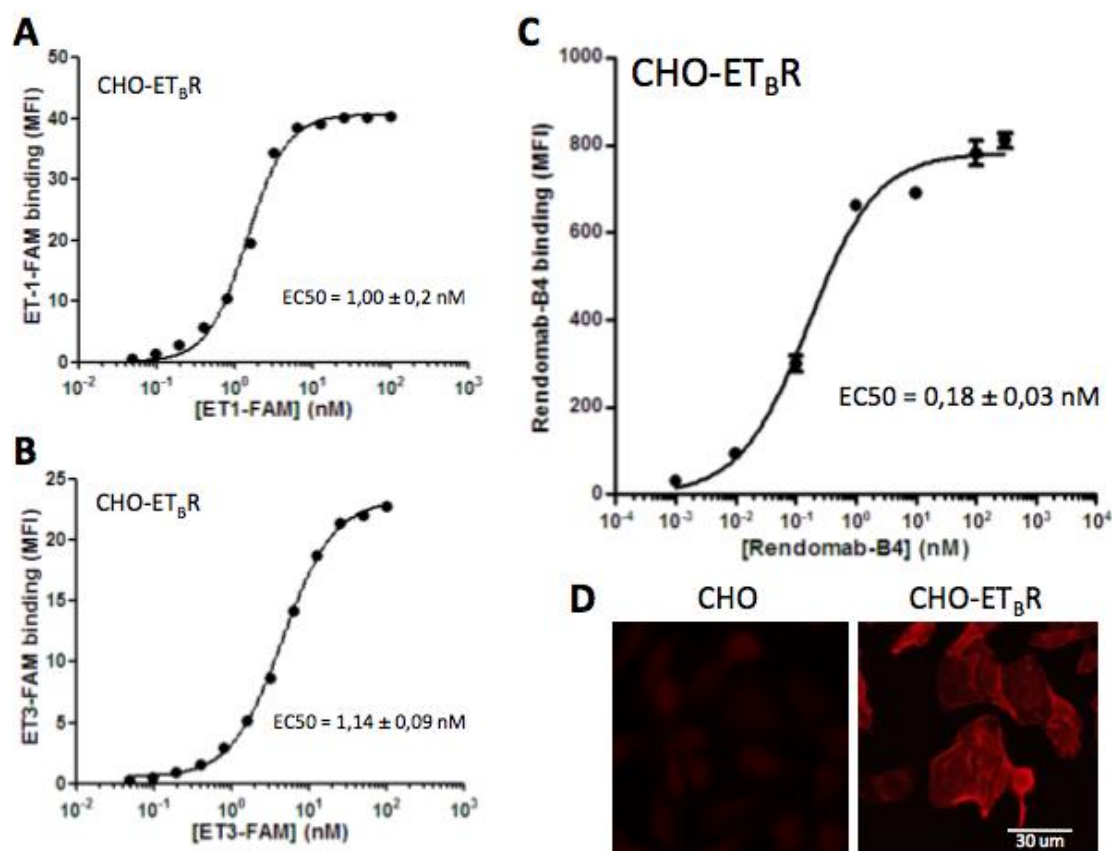


Figure 2. Rendomab-B4 specifically recognizes with high affinity human ET_BR overexpressed in CHO cell line. To check human ET_BR expression on CHO-ET_BR surface, cells were incubated with increasing concentrations of ET-1-FAM (**A**) and ET-3-FAM (**B**) for 24 h at 4°C in the dark. (**C**) To determine rendomab-B4 affinity, increasing concentrations of the monoclonal antibody were incubated with CHO-ET_BR cells for 24 h at 4°C. Rendomab-B4 binding was revealed using R-PE-labeled anti-mouse antibody. The binding of labeled-peptides and monoclonal antibody were measured on a GUAVA flow cytometer and resulting curves (**A**, **B** and **C**), which correspond to mean fluorescence intensity (MFI) as a function of ligand concentrations, were plotted and fitted using GraphPad Prism software. Half maximal effective concentration values (EC₅₀) correspond to the mean \pm s.d. of three (**A** and **B**) or five (**C**) independent experiments. (**D**) CHO and CHO-ET_BR cells were fixed and incubated with 100 nM of rendomab-B4, followed by Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody incubation.

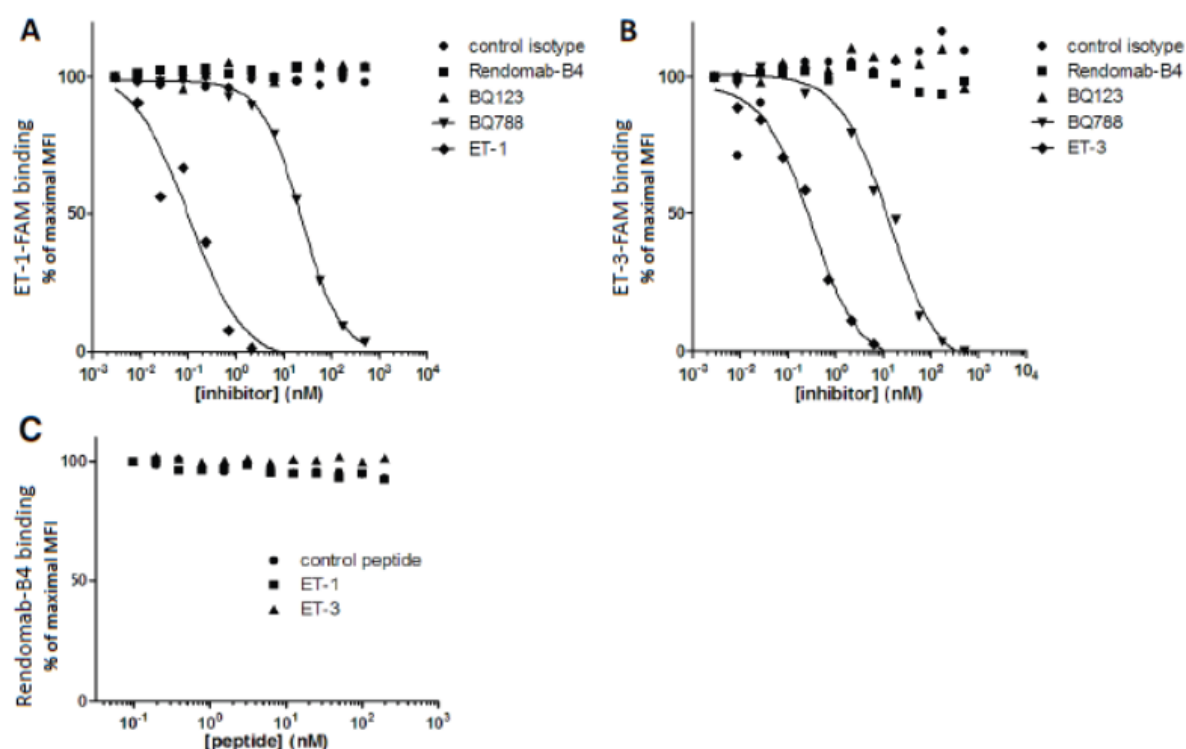


Figure 3. Rendomab-B4 does not compete with ET-1 and ET-3 binding on CHO-ET_BR.

CHO-ET_BR cells were incubated with 10 nM of ET-1-FAM (A) or ET-3-FAM (B) and simultaneously with increasing concentrations of isotype control antibody, rendomab-B4, selective receptor antagonists (BQ123 or BQ788) and the corresponding unlabelled endothelin (ET-1 or ET-3). (C) Cells were incubated simultaneously with 100 nM of rendomab-B4 and with increasing concentrations of endothelin (ET-1 or ET-3) or control peptide. Rendomab-B4 binding on cell surface was detected with a R-PE-labeled anti-mouse antibody. The fluorescence (A, B and C) was quantified by flow cytometry. Inhibition binding curves, corresponding to MFI relative to competitor concentration, were plotted and fitted with GraphPad Prism software. Two independent experiments were performed.

Rendomab-B4 recognizes a discontinuous epitope on hET_BR N-terminal domain.

To further characterize the binding site of rendomab-B4 on hET_BR, epitope mapping experiments were performed. Pepscan membranes spotted with overlapping dodecapeptides, frameshifted by one residue, and corresponding to the N-terminal part and extracellular loops (E1, E2, E3) of the hET_BR were used. Indeed, the immunization protocol that was carried out was expected to lead to the production of antibodies directed against the extracellular parts of the ET_BR. As shown in **Figure 4A**, the membrane incubated with rendomab-B4 displayed

two immunoreactive regions, one from A₂₁ to B₈ and another from C₁₇ to C₂₄ spots, corresponding, respectively, to residues 28 to 38 and 70 to 77. The two series of immunoreactive peptides are part of the N-terminal domain, as represented in **Figure 4B and 4C**. The deduced minimal sequences were ERGFPPDRATP and EVPKGDRIT. The first sequence corresponds to the most N-terminal region of the mature receptor, once signal peptide is cleaved. The absence of any similarity between the two sequences suggested that rendomab-B4 recognized a conformational epitope formed by the juxtaposition of two regions of the receptor.

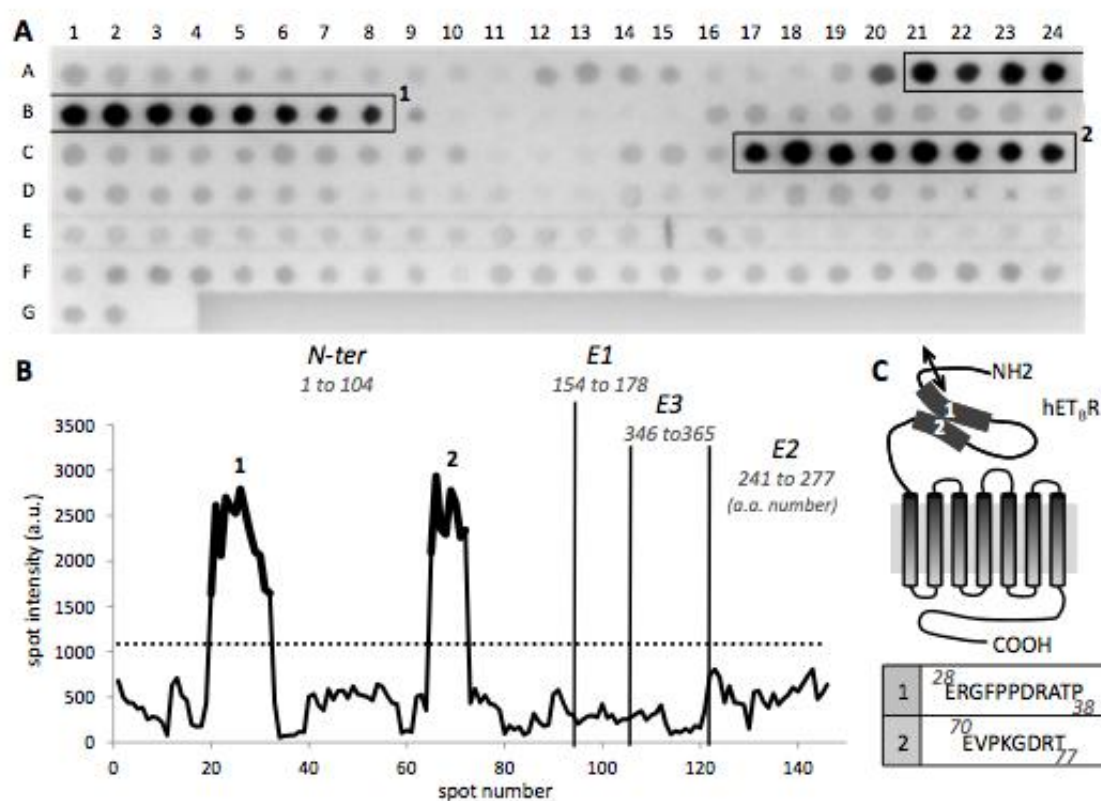


Figure 4. Rendomab-B4 recognizes a discontinuous epitope on hET_BR N-terminal tail.

(A) To determine rendomab-B4 epitope, a Pepscan membrane spotted with dodecapeptides corresponding to extracellular domain and loops of the ET_B receptor, was used. Hybridized monoclonal antibody was revealed using an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody. The highest consecutive reactive spots are in boxes 1 and 2. Each spot signal obtained on the membrane was quantified using ImageJ software. (B) The profile of hybridization of rendomab-B4, corresponding to the spot intensity as a function of the spot number on the membrane, was drawn. Vertical lines symbolize the separation between N-

terminal (N-ter) domain and extracellular loops (E1, E2 and E3) of the receptor. The numbers of the amino acids at the extremities of each domain are indicated in italics. The dotted line corresponds to three times the background calculated as the mean intensity of all the spots except those in boxes. Parts of the curve in bold print (1 and 2) correspond to spots in boxes drawn in **A**. **(C)** Schematic representation of the human ET_BR and localization of the rendomab-B4 regions of recognition (1 and 2). The double arrow symbolizes the cleavage site of ET_BR signal peptide. Corresponding amino acid sequences of regions 1 and 2 are indicated in the table below. This experiment was done twice with two independent membranes. Isotype control antibody generated no staining (data not shown).

Rendomab-B4 specifically recognizes ET_BR in melanoma cell lines: binding properties

Considering that rendomab-B4 was able to bind human ET_BR in CHO cells with high affinity and specificity, its binding on human melanoma cell lines and on non-malignant cell lines expressing ET_BR was further investigated in more details. Results in **Figure 5A**, show that rendomab-B4 clearly displays saturable binding curves on three melanoma cell lines, nevertheless we note different apparent affinities. By contrast, most interestingly, no specific binding of rendomab-B4 was observed in the non-tumoral, yet ET_BR expressing cells, HEK293T and HUVEC (**Fig. 5A**). This result further supports our previous assumption of the occurrence of tumor-specific conformations of ET_BR.²⁵ Since its apparent affinity was also higher in this cell line ($EC_{50} = 0.14 \pm 0.03$ nM) than in the two other ones (1.5 ± 0.32 nM and >10 nM in WM-266-4 and SLM8, respectively, **Fig. 5A**), and that, in addition, among the nine mAbs of group A, rendomab-B4 displayed the best apparent affinity for UACC-257 (**Fig. 5B**), this cell line was chosen for further characterization of the fine binding properties and pharmacological effects of the antibody on tumor cells. **Figure 5C** shows the saturable binding on UACC-257 cells of labeled ET-3, which is a specific agonist of ET_BR, known to play a leading role in melanoma development. This binding is characterized by an EC_{50} value of 3.8 ± 0.1 nM, which is in the same order of magnitude as that obtained in CHO-ET_BR cells (**Fig.2B**). Competition experiments revealed that, as expected, ET-3 and BQ788 were able to fully inhibit ET-3-FAM binding, while control antibody and BQ123 were without any effect

(Fig. 5D). Moreover, as already observed in CHO-ET_BR cells, rendomab-B4 was not able to reduce ET-3-FAM in UACC-257 cells, confirming that rendomab-B4 is not a competitor of ET-3 binding on hET_BR.

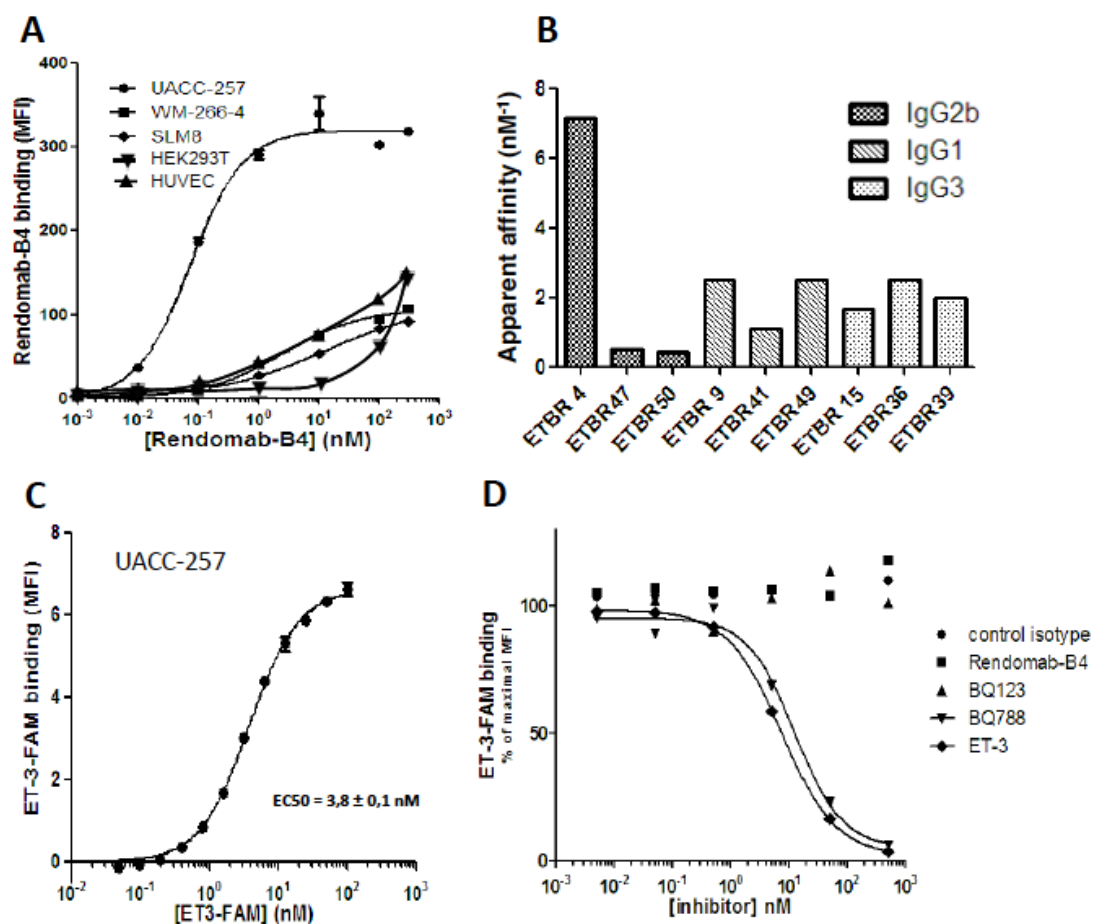


Figure 5. Rendomab-B4 specifically recognizes ET_BR in melanoma: Binding properties.

(A) Human melanoma cell lines (UACC-257, WM-266-4 and SLM8), HEK293T and HUVEC were incubated with increasing concentrations of rendomab-B4. Rendomab-B4 binding was evaluated using R-PE-labeled anti-mouse antibody followed by flow cytometry analysis. The results are representative of three independent experiments. (B) The apparent affinities on UACC-257 of the nine antibodies of the group A (Fig. 1A) are reported. (C) To control human ET_BR expression at the surface of UACC-257 cells, the cells were incubated with varying concentrations of ET-3-FAM and fluorescence was measured by flow cytometry. Three independent experiments were performed. (D) UACC-257 melanoma cells were simultaneously incubated with 10 nM of ET-3-FAM and increasing concentrations of isotype control antibody, rendomab-B4, selective antagonists of ET_AR (BQ123) or ET_BR (BQ788) or unlabelled ligand ET-3. The fluorescence was quantified by flow cytometry. All these curves (A, C and D) were plotted and fitted using GraphPad Prism software.

Rendomab-B4 is internalized in UACC-257 cells.

Given that ET_BR-targeting-rendomab-B4 binds UACC-257 cells with high affinity, and that ET_BR is known to have high internalization and turnover rates,^{27, 28} the internalization of the rendomab-B4 was studied in these melanoma cells. Indeed, internalization of a mAb is a crucial property, since it permits the uptake into cancer cells expressing the target of a cytotoxic drug coupled to the mAb.^{17, 29} Cytometry experiments were carried out to study the internalization of ET_BR in UACC-257 cells (**Fig. 6A**). Because no competition was observed between ET-3 and rendomab-B4 binding on UACC-257 (**Fig. 3B**), rendomab-B4 was used to quantify receptors present at the surface of the cells after incubation of living adherent cells with ET-3 in different conditions. The maximal binding was determined by incubating the cells with ET-3 for 1 h at 4°C, condition where internalization is blocked. Incubation of the cells with ET-3 for 1 h at 37°C, a temperature for which internalization can occur, led to a decrease of the fluorescent signal by about 70%. This signal decrease reflects a massive ET-3-mediated internalization of ET_BR. In **Figure 6B**, the internalization of the rendomab-B4 was analyzed. To avoid internalization of the receptor and to obtain the maximal binding, adherent UACC-257 cells were first incubated for 3 hours at 4°C with the rendomab-B4. To allow the internalization, the cells were incubated for 3 hours at 37°C. This resulted in a signal decrease by about 40%. Moreover, when ET-3 was added to the cells and incubated for one additional hour at 37°C still in the presence of rendomab-B4, the signal - was further reduced by about 80%. In control experiments, no binding was observed with an isotypic control antibody (data not shown). Thus, rendomab-B4 is internalized by UACC-257 cells and this effect is increased in the presence of the agonist ET-3, reaching a percentage of internalization higher than that obtained with ET-3 alone, suggesting that rendomab-B4 by itself is able to promote ET_BR endocytosis to some extent. Immunofluorescence analysis of rendomab-B4 binding on UACC-257 living cells at 4°C is shown in **Figure 6C**. The result clearly shows that rendomab-B4 bound to the UACC-257 cell surface as it was also observed in CHO cells

expressing hET_BR. After 2 hours of incubation at 37°C, the labeling disappeared from the cell membrane (**Fig. 6D**) and appeared as a punctuate labeling in the cytoplasm, reflecting the internalization of the mAb. As expected, this labeling obtained with rendomab-B4 colocalized with Early Endosome Antigen 1 (EEA1) staining.

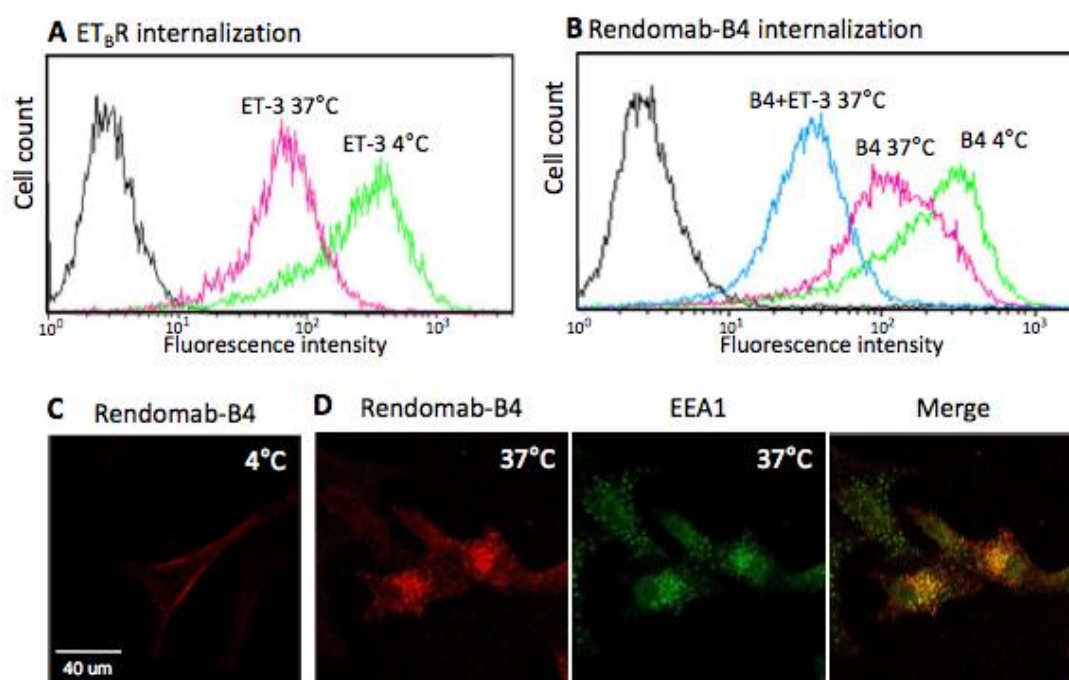


Figure 6. Rendomab-B4 is internalized in UACC-257 cells. Flow cytometry experiments were performed to study internalization of ET_BR (**A**) and to study the internalization of rendomab-B4 itself (**B**). (**A**) Living, adherent UACC-257 cells were incubated at 4°C (green curve) or 37°C (pink curve) in medium in the presence of 50 nM ET-3. After washing, cells were detached and incubated for 2 hours at 4°C with rendomab-B4 in order to evaluate ET_BR amount at the surface of the cells. Cells were then incubated with a fluorescent secondary antibody and the fluorescence was measured using a FACScalibur cytometer. Black curve corresponds to basal fluorescence. (**B**) UACC-257 living cells were incubated for 3 hours at 4°C (green curve) with 100 nM rendomab-B4. Cells were incubated for 3 hours at 37°C with 100 nM rendomab-B4 prior to 1 additional hour incubation at 37°C with 50 nM ET-3 (blue curve) or not (pink curve). Cells were then detached and remaining antibodies at cell surface were detected using secondary antibody. The fluorescence was quantified by flow cytometry. (**C and D**) Living UACC-257 cells were incubated for 2 h at 4°C (**C**) or 37°C (**D**) with rendomab-B4, fixed and incubated in Cy3-anti-mouse antibody (red). Green labeling in (**D**) corresponds to early endosomal antigen 1 (EEA1) staining. Merged image is represented.

Rendomab-B4 inhibits PLC but not ERK response due to ET_B receptor activation in UACC

Although rendomab-B4 does not compete with endothelin binding on hET_BR it is not excluded that it may exert allosteric modulation on receptor activity or may reduce the number of receptors at the cell surface as suggested by the internalization results described above. Therefore, the impact of rendomab-B4 on signaling pathways coupled to hET_BR in UACC-257 cells was investigated. It is well established that ET_BR is coupled to Gq and Gi families of G proteins, leading to the activation of phospholipase C (PLC) and ERK1/2 MAP kinases pathways. Data shown in **Figure 7A** showed that incubation of UACC-257 cells with ET-1, but also with ET-3, stimulated by about 5 times the PLC activity, as reflected by the increased production of InsPs. Incubation of the cells for 2 hours in the presence of control isotype antibody had no effect. By contrast, a similar treatment with the rendomab-B4 strongly reduced (by about 75 %) the production of InsPs stimulated by ET-1 and ET-3. These data indicate that rendomab-B4 is able to reduce the PLC transduction pathway without interfering with the binding of endogenous receptor ligands.

The MAP kinases pathway is known to be involved in tumor progression in melanoma. Therefore, we also investigated the potential impact of rendomab-B4 on this pathway. Our data confirmed that in UACC-257, both ET-1 and ET-3 increased ERK1/2 phosphorylation and activation as previously shown.¹⁷ Indeed, in UACC-257, the two ETs induced a rapid increase of ERK1/2 phosphorylation, with a maximal response obtained at 5 to 10 min followed by a progressive decrease (data not shown). The impact of rendomab-B4 was then tested on the activation of ERK1/2 by ET-1 and ET-3 (**Fig. 7B**). Data depicted in **Figure 7C** clearly indicate that the activation of ERK1/2 was unaffected when UACC-257 were treated in the presence of rendomab-B4, as it was observed using control mAb. These results show that rendomab-B4 exhibits differential inhibitory effects on PLC and ERK pathways activated by ETs.

Rendomab-B4 inhibits melanoma cell migration induced by endothelin.

It is now well established that the endothelin axis plays an important role in cancer progression, triggering cellular events involved in cancer cells invasion. Given this crucial role, we next studied the impact of rendomab-B4 on ET-1-induced migration of UACC-257. Data shown in **Figure 8** demonstrated that the migration of the melanoma cell line was 3-fold higher in presence of ET-1, by comparison to untreated cells. Incubation of the cells with control antibody failed to modify the cell migration due to ET-1. By contrast, rendomab-B4 completely abolished UACC-257 cells migration induced by ET-1. It was checked that under “similar conditions, the viability and the number of cells were not affected by ET-1 and rendomab-B4 (data not shown). Altogether, these results show that although rendomab-B4 does not prevent endothelin binding on ET_BR, it is able to inhibit several of their effects on melanoma cells.

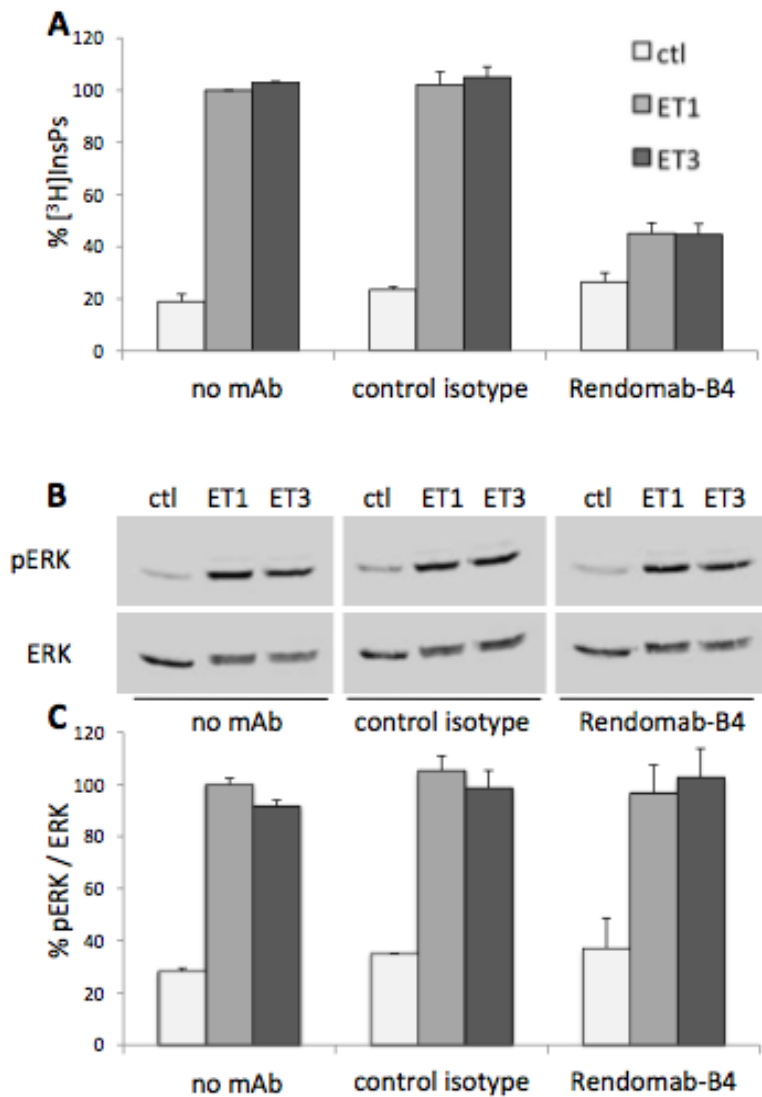


Figure 7. Rendomab-B4 inhibits PLC but not ERK response due to ET_B receptor activation in UACC. (A) [3H]inositol-labeled UACC-257 cells were treated or not for 2 h with 150 nM of control isotype antibody or Rendomab-B4 before stimulation for 30 min in the presence or the absence of 50 nM ET-1 or ET-3. Total [3H]InsPs amount was determined as described in materials and methods. Results are expressed as percent of InsPs production induced by ET-1 in the absence of antibody and are means \pm SEM of 6 independent experiments, each performed in duplicate. (B) Cells were treated for 2 h with or without 150 nM of control isotype antibody or rendomab-B4 before the addition of 10 nM ET-1 or ET-3. After a 10 min incubation, cells were lysed and total proteins were analyzed by 10% SDS/PAGE followed by immunoblotting with anti-active phosphorylated ERK1/2 (pERK) antibody and anti-total ERK2 (ERK). pERK and ERK signals were quantified (C), and the levels of phosphorylated ERK1/2 were normalized with respect to total ERK2 amount in corresponding sample. Results were expressed as percent of ET-1 stimulation without antibody treatment (100%). Values are the means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate.

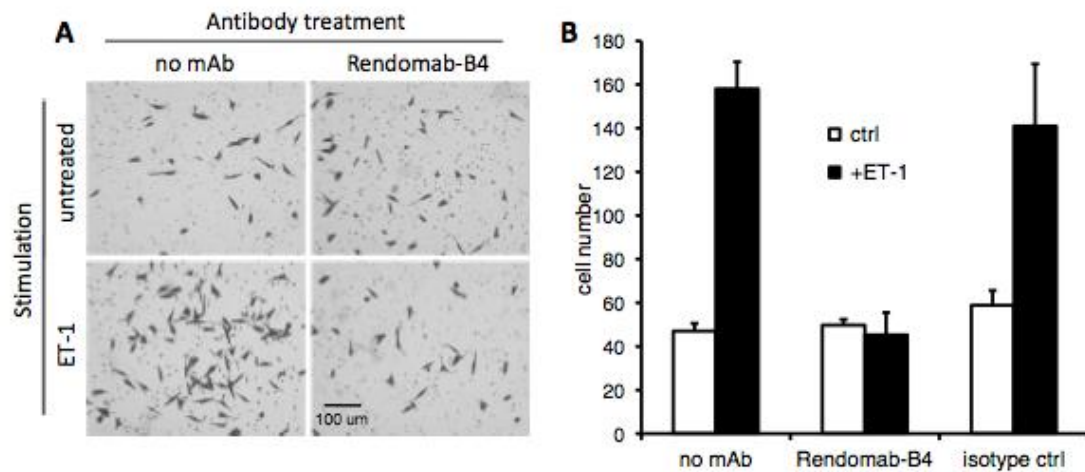


Figure 8. Rendomab-B4 inhibits melanoma cell migration induced by endothelin. UACC-257 (150 nM) seeded in culture inserts were treated for 2 h with or without 150 nM of rendomab-B4 or control isotype antibody before the addition of 10 nM ET-1. After 20 h of incubation, cells were stained with crystal violet and counted from three randomly selected images per insert. **(A)** Images of UACC-257 cells on the lower side of the insert membranes. **(B)** Quantification of the number of cells present on the lower side of the insert membranes. Values are the means \pm SEM of three independent experiments.

DISCUSSION

The development of mAbs for the treatment of cancers is an alternative to conventional therapeutic agents and is currently a booming sector. In the particular case of metastatic melanoma treatment, the anti-CTLA-4 blocking antibody ipilimumab and the anti-PD-1 antibodies pembrolizumab and nivolumab that modulates the immune checkpoints, have been recently approved.³⁰⁻³² However, despite the improvement of overall survival observed with these mAbs, they do not lead to remission of the disease. Several studies clearly established that ET_BR plays a pivotal role in melanoma and represents a good candidate for therapeutic strategies.^{12, 20, 33-35} Despite the promising results obtained with the dual receptor antagonist bosentan in melanoma cell lines,³⁶ the two phase II studies in patients with stage IV metastatic melanoma were disappointing.^{22, 23} Used as a monotherapy, bosentan only stabilized less than 20% of the patients,²² and no additional effect on temporal progression of tumors was observed when bosentan was combined with a chemotherapeutic agent (dacarbazine).²³ The pharmacokinetic properties of these small antagonists (bosentan), rapidly eliminated and combined with a local ET-1 high concentrations, may account for the failure of this treatment. Hence new therapeutic molecules, like antibodies, targeting ET_BR but not displaced by ET-1, need to be developed in order to inhibit the pleiotropic effects on tumour cells induced by the endothelin axis. In a previous study we reported the *in vitro* characterization of rendomab-B1, a mAb directed against human ET_BR. Rendomab-B1 was the first-reported mAb behaving as a potent antagonist of human ET_BR, blocking ET-1-induced signaling in CHO overexpressing ET_BR and recognizing ET_BR on HUVEC. Nevertheless, rendomab-B1 recognizes only with a poor affinity ET_BR overexpressed at the surface of melanoma cells, revealing a structural heterogeneity among ET_B receptors.²⁵ In the present study we have selected and characterized another anti-ET_BR mAb, rendomab-B4, on the criterion of melanoma recognition.

We first characterized the rendomab-B4 pharmacological properties in CHO cells stably expressing human ET_BR. Experiments using flow cytometry demonstrated that rendomab-B4 recognized human, but not rat, ET_BR with high affinity and without any cross-reactivity with ET_AR in living cells.

Data from epitope mapping technique demonstrated that rendomab-B4 recognized an epitope formed by two noncontiguous sequences present in the N-terminal domain of the receptor. The finding that rendomab-B4 targets a conformational epitope is consistent with complementary results which show that this antibody does not recognize hET_BR in western blot, a condition where the receptor is in a denatured form, but is able to immunoprecipitate it from a cell lysate, a condition where the receptor is under its native form (data not shown). These results of rendomab-B4 epitope mapping constituted a clue concerning the conformation of the receptor, since it provides the information about the proximity of the two distinct sequences of ET_BR recognized by rendomab-B4. Epitopes formed by discontinuous sequences were already described such as for the rendomab-B1, which recognized three discontinuous regions in extracellular domains of the receptor; more precisely, two other sequences in the N-terminal domain of ET_BR and one in the extracellular loop E2.²⁵ Other monoclonal antibodies recognizing discontinuous epitopes have already been described. Indeed, monoclonal antibodies directed against epithelial cell adhesion molecule EPCAM³⁷ or against glycoprotein B of herpes simplex virus³⁸ were also shown to bind discontinuous epitopes.

The crystal structure of the human ET_BR has yet to be solved and the precise binding site for ET-1 and ET-3 has not been clearly defined by site directed mutagenesis or molecular modeling approaches. However, TMI-III, VII and extracellular loops appear to contain agonist binding motif^{39, 40} and the E1 loop seems to be more particularly involved in the interaction with ET-1.⁴¹ The epitope sequences deduced from epitope mapping experiments are exclusively located in the N-terminal part of the receptor, a region that has not been

implicated in ligand binding. This observation is consistent with our binding data showing that there was no competition between rendomab-B4 and ETs.

Although rendomab-B4 did recognize ET_BR on melanoma cells with high affinity, it is striking to observe that it was unable to bind ET_BR on HEK293T and HUVEC, thus displaying different binding properties compared to those of rendomab-B1.²⁵ These diverging properties may be explained by differential levels of ET_BR expression, specific cellular context such as receptor interacting proteins or post-translational modifications in the various studied cell lines. Based on this background, it is tempting to speculate that rendomab-B4 may recognize ET_BR in cells that overexpress oligomerized receptor, *i.e* in UACC-257 or in CHO-ET_BR. In CHO-expressing ET_BR, the population of ET_BR may be heterogeneous, constituted both by monomers, recognized by rendomab-B1, and oligomers, recognized by rendomab-B4. This hypothesis could explain that rendomab-B1 is able to recognize human ET_BR in endothelial cells (HUVEC), which are supposed to mainly express monomers, whereas rendomab-B4 recognizes melanoma, which are supposed to mainly express oligomers. Alternatively, as stated above, post-translational modifications, particularly glycosylation that occurs at the level of N-terminal tail of ET_BR⁴², may impact the binding of the mAb. Indeed, a glycosylation site in the N-terminal region of ET_BR (N59) is located between the two sequences constituting the epitope. Then, modifications in the glycosylation status of this site may influence binding properties of the rendomab-B4 and may contribute to the different binding properties of rendomab-B1 and -B4. A modification of glycosylation at this site in melanoma cells is not unlikely since it is now well demonstrated that the glycosylation of many cell surface proteins is altered in cancer cells.⁴³ ET_BR has been demonstrated to possess a proteolytic cleavage site (R64/S65), leading to a truncated form of the receptor.^{44, 45} However, the nature of the protease involved in this truncation has not been clearly established and may differ from one cell type to another. Truncation of the hET_BR at R64/S65 site would lead to the loss of the first part of the rendomab-B4 binding epitope. If we assume that the ratio between the full length and the truncated form of ET_BR is different

among the cell lines, this could explain the differential binding properties of rendomab-B1 and rendomab-B4 on the melanoma cells compared to normal cells. Further investigations, such as site directed mutagenesis experiments, would be needed to fully explain the difference between rendomab-B1 and rendomab-B4 immunoreactivity.

It has been reported that, compared to ET_AR, ET_BR is rapidly internalized and degraded.^{27, 28} Interestingly, we observed that rendomab-B4 was internalized in UACC-257 cells and the internalization was increased in presence of ET-3, known to play a crucial role in melanoma invasiveness.^{46, 47} These results were reinforced by immunofluorescence experiments. Indeed, we observed the internalization of ET_BR in presence of ET in the melanoma cell line, which was accompanied by the internalization of rendomab-B4. Furthermore the internalized complexes were detected in endosomes. This property of internalization of rendomab-B4, associated associated with the high expression level of ET_BR in melanoma cells, is particularly important because the mAb could be used as antibody-drug conjugate (ADC) able to drive and to deliver the cytotoxic molecules specifically into melanoma cell overexpressing the ET-3/ ET_BR axis, increasing ADC-mediated cell killing. In line with this interpretation, it has been demonstrated that a relationship exists between ET_BR density and ADC efficacy in UACC-257 cell line of mAb 5E9 raised against ET_BR.^{17, 48}

Although we observed that rendomab-B4 does not compete with ETs for binding on ET_BR, the possibility that this mAb may modulate ET_BR dependent signaling processes was investigated. Indeed, increasing data indicate that GPCR signaling may be regulated by allosteric modulators that do not bind to the orthosteric site of the receptor.⁴⁹⁻⁵¹ Interestingly, we found that rendomab-B4 was able to inhibit PLC activation, which is a G protein dependent process, but had no effect on ERK1/2 activation induced by ET-1 or ET-3. Comparable results were obtained in HEK293 cells expressing angiotensin I receptors, where a synthetic peptide mimicking the second intracellular loop of the receptor inhibits angiotensin II-mediated PLC activation and Ca²⁺ influx, but does not alter ERK1/2 activation.⁵² Futhermore, ORG27569, an allosteric ligand for the CB1 cannabinoid receptor,

was found to inhibit G protein signaling but induced ERK1/2 activation.⁵³ To our knowledge, rendomab-B4 is the first reported mAb to possess the ability to differentially impact ETBR-coupled signaling pathways. Indeed, recently, Asundi et al.⁴⁸ reported the production of an anti-ET_BR antibody but this antibody failed to inhibit PLC and ERK1/2 activation

As mentioned before, ET_BR plays a crucial role in metastatic spread of melanoma, which is the critical step of the disease. Taking into account this property of the endothelin axis, migration assays were performed and they demonstrated that rendomab-B4 is able to completely inhibit the migration induced by ET-1. This inhibition of melanoma cell migration suggests that rendomab-B4 may be a powerful tool to decrease metastasis *in vivo*.

The mechanism by which rendomab-B4 inhibits PLC activity and migration induced by endothelin is not clear. An intuitive hypothesis would be that rendomab-B4, by promoting internalization of ET_BR, reduces the number of ET_BR at cell surface, which would lead to a reduction of endothelin effects. However, the limited effect of rendomab-B4 on ETBR internalization cannot account for the high inhibition observed on PLC activity and migration. This suggests that internalization is not the only mechanism of action of rendomab-B4 and that this mAb possibly exerts allosteric modulation at the level of ET_BR.

In conclusion, the anti-human ET_BR monoclonal antibody, rendomab-B4, displays remarkable features, which are unique and not observed with the other anti ET_BR mAbs described yet.¹⁷ On the one hand, rendomab-B4 specifically binds to ET_BR expressed on cancer cells with a very high affinity, on the other hand it is internalized by these cells and blocks their migration. These properties make rendomab-B4 a promising candidate for the therapy and /or diagnostic of melanoma.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six-week-old female C57BL/6 mice (Elevage Janvier) were kept in a specific pathogen-free animal facility. All animal experiments complied with French animal experimentation regulations.

Plasmids

The cDNA clone of the human ET_BR (generous gift from Dr. M.J. Brownstein, Bethesda, MD, USA) was subcloned in pcDNA3.1 vector (Life Technologies). The integrity of the construct was confirmed by sequencing.

Cell culture and transfection

CHO-K1 cells (ECACC) were cultured in Ham-F12 medium, HEK293T (EACC) and human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC, ATCC) in DMEM medium. Melanoma cell line UACC-257 (NCI-60 cell collection) was cultured in RPMI-1640. Melanoma cell lines WM-266-4 (ECACC) and SLM8 (kind gift from Dr M. Viguiere, Hôpital Saint-Louis, Paris, France) were cultured in DMEM: Ham-F12 medium (1:1). All media were supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Eker rat uterine leiomyoma cells (ELT-3, kindly provided by Dr. C. Walker, Anderson Cancer Center, University of Texas, Smithville, TX, USA) were cultured in DF8 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. All media and cell culture supplements were from Life technologies. The ET_BR expression vector was transfected and stably overexpressed in CHO and HEK cells using FUGENE HD reagent (Roche Diagnostics). Human ET_AR stably transfected CHO cells were kindly provided by Dr. M. Iglarz (Actelion). Stably transfected cells expressing human ET_BR or ET_AR were termed CHO-ET_BR, CHO-ET_AR or HEK-ET_BR, and they were always cultured in the presence of 1 mg/ml G1418.

DNA immunization protocol and production of monoclonal antibodies

Monoclonal antibody production, by DNA immunizations, was performed as previously described⁵⁴: collected splenocytes of the two best responding mice were fused to NS1 mouse myeloma cells. Hybridoma supernatants were screened for production of anti-ET_BR specific antibodies by a living cell-based ELISA test, using untransfected CHO cells and CHO-ET_BR cells as targets, prior to confirmation of specificity and reactivity of antibodies by flow cytometry. After subcloning by limiting dilutions, antibodies were isotyped using a mouse immunoglobulin isotyping kit according to the manufacturer (Pierce) instructions and purified by affinity chromatography on Protein A-Sepharose (Millipore).

Flow cytometry analysis

- Affinity determination

For affinity measurements, saturation binding experiments were performed with stably transfected CHO-ET_BR, melanoma cell lines (UACC-257, WM266-4 and SLM8), HEK293T and HUVEC. Collected cells were seeded (100,000 cells/well) in V-shaped 96-well plates. Plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were incubated overnight at 4°C with 100 µL of D-PBS supplemented with 0.1% BSA and 5% normal goat serum (NGS, Life Technologies) and containing increasing concentrations of rendomab-B4. After two washes with 150 µL of ice-cold D-PBS - 0.1% BSA - 1% NGS, cells were incubated for 2 h at 4°C in the dark with R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch). After two washes, cells were re-suspended in 100 µL of D-PBS and their fluorescence was measured using a GUAVA flow cytometer (Guava Easycyte Plus, Millipore). Mean fluorescence intensity (MFI) of samples was then calculated. To control ET_BR expression at the cell surface, increasing concentrations of fluorescein-labeled ET-1 or ET-3 (ET-1-FAM or ET-3-FAM, Phoenix Pharmaceuticals) were used.

- *Competition experiments*

For competition tests, CHO-ET_BR or melanoma cells (UACC-257) were treated according to two different protocols. (i) Cells were co-incubated with 10 nM ET-1-FAM or ET-3-FAM and varying concentrations of different competitors (rendomab-B4, control isotype antibody, ET-1, ET-3, selective ET_AR receptor antagonist (BQ123) or selective ET_BR receptor antagonist (BQ788). (ii) Cells were co-incubated with fixed rendomab-B4 concentration (10 nM) and varying concentrations of competitor peptides ET-1, ET-3. To reach equilibrium, cells were incubated overnight at 4°C. For type (i) experiments, cells were washed twice before measuring the fluorescence. For type (ii) experiments, after two washes, cells were incubated for 2 h with (R-PE)-conjugated secondary antibody. The MFI of the cells was measured using a GUAVA cytometer.

- *Receptor and rendomab-B4 internalization*

To study receptor and antibody internalization in UACC-257 cell line, 300,000 cells were used per assay. The internalization of the receptor due to endothelin was evaluated by incubating living adherent cells for 1 h at 4°C or 37°C with 50 nM ET-3. After detachment, cells were incubated for 2 h at 4°C in D-PBS - 0.1% BSA - 5%NGS with 100 nM rendomab-B4, washed twice and were incubated for 2 h at 4°C with (R-PE)-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L). Cells were washed twice and the fluorescence was analyzed.

For antibody internalization experiments, living adherent cells were incubated for 3 hours at 4°C or 37°C with either 100 nM rendomab-B4 or control isotype antibody. Cells were incubated for one additional hour with or without 50 nM ET-3. Then, cells were detached and incubated for 2 h at 4°C with (R-PE)-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) and were washed twice again.

For these two kinds of experiments, cell fluorescence was finally assayed using a FACSCalibur flow cytometer (FACSCalibur Flow Cytometry System, BD Biosciences) and the MFI determined.

Microscopy analysis

- Wide-field microscopy analysis

Wide-field microscopy analysis was performed on CHO and CHO-ET_BR cell lines seeded on glass coverslips at the density of 15,000 cells per cm². After 48 h, cells were washed in PBS and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature. Cells were then incubated for 10 min in 50 mM NH₄Cl and washed once with PBS. Cells were then incubated at room temperature for 1 hour in the presence of 100 nM of rendomab-B4 in PBS-1% BSA. This incubation is performed in the absence of detergent in order to only detect membrane receptors at the cell surface. After three successive washes with PBS, cells were incubated for 1 h with PBS - 1% BSA containing Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). After three washes, cells were mounted on slides with Fluoroshield containing DAPI (Sigma-Aldrich). Images were taken using a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot II), at 40x magnification.

- Confocal microscopy analysis

Confocal microscopy analysis was performed on UACC-257 cells seeded on glass coverslips at a density of 30,000 cells per cm². For internalization experiments, living cells were incubated at 4 or 37 °C for 1 h with 100 nM of rendomab-B4 before fixation with 4% PFA. To stain the endosomal compartment, cells were permeabilized by treatment for 15 min with PBS - 1% BSA - 0.2% Triton X-100 before incubation with an anti-EEA1 antibody (Millipore, France). After three washes, cells were incubated in PBS - 1% BSA - 0.2% Triton X-100 containing Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody and FITC-conjugated anti-rabbit antibody. Images were taken using a confocal microscope (Zeiss LSM510), at 63x magnification.

Peptide synthesis and ET_BR-binding epitope mapping

The entire extracellular amino acid sequence of the ET_BR receptor was synthesized on a cellulose membrane using the previously described SPOT technique⁵⁵, laying down

overlapping 12-mer peptides, frameshifted by one residue. Rendomab-B4 epitope mapping was performed according to a protocol previously described⁵⁴, incubating the membrane in 1 µg/µL (6 µM) of rendomab-B4 for 90 min at room temperature. The hybridization was revealed using an anti-mouse IgG labeled with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich). ImageJ software was used to quantify the signal obtained for each spot. Peptides were considered as antigenically relevant if they were part of a consecutive series of reactive spots, presenting at least one signal peak three times higher than the background.⁵⁵

Measurement of PLC activity

Confluent UACC-257 cells seeded in 12-well plates were serum starved for one night in MEM in the presence of 10 µCi/ml Myo-[2-³H]inositol (16 Ci/mmmol; PerkinElmer). The cells were washed three times with MEM and then incubated at 37°C for 2 h in 800 µl of MEM in the presence of 150 nM rendomab-B4 or control isotype antibody. Cells were then exposed to the agonists ET-1 or ET-3 (50nM) in the presence of 10 mM LiCl (added 20 min before the agonists). Total inositol phosphates (InsPs) produced by PLC were quantified as previously described.²⁶ Results were expressed as the mean +/-SEM of at least three independent experiments performed in duplicate.

Western blot analysis of phosphorylated ERK1/2

Confluent UACC-257 cells seeded in 12-well plates were serum starved for one night in RPMI and then incubated at 37°C for 2 h in 800 µl of MEM in the presence of 150 nM rendomab-B4 or control isotype antibody. Cells were then exposed to the agonists ET-1 or ET-3 (50nM) for 5 min and then lysed in 50 µl lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10% glycerol, 10 mM Na₄P₂O₇, 200 µM Na₃VO₄, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 µg/ml aprotinin and leupeptin). Detergent-extracted proteins were analyzed by western blot technique using mouse monoclonal anti-active phosphorylated ERK1/2 (Cell Signalling Technology) and rabbit polyclonal anti-ERK2 (Santa Cruz

Biotechnology) antibodies (1:5000 each). The membranes were then incubated with anti-rabbit IgG antibody conjugated to IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) and anti-mouse IgG antibody conjugated to AlexaFluor 680 (Life technologies) for 1 h at 37°C. Protein bands were detected and quantified on a two-color Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Migration assay

UACC-257 cells were seeded within cell culture inserts (Falcon PET membrane with 8 µm porosity) placed in a 24 well plate (30,000 cells/insert). After 8 h of culture, media were removed and the cells were incubated for 2 h in RPMI medium without FCS, in presence or absence of 150 nM randomab-B4 or 150 nM antibody control. Cells were then stimulated or not by addition of 50 nM ET-1 in the two compartments. After 20 h, inserts were removed and the cells were stained with crystal violet (0.1% in 20% ethanol). After scrapping off non-migrated cells, the inserts were observed on an Axiophot II Zeiss microscope and images were taken at low magnification. The mean number of cells present on each insert was determined from three randomly selected images.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Karine Moreau and Marc Plaisance for their expert assistance with monoclonal antibody production, and Jean-Charles Robillard for animal experiments. This work was supported by grants from Université Paris Diderot, Université Paris Sud-11, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA, France). A.B was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

1. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:235-55.
2. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.
3. Tanfin Z, Leiber D, Robin P, Oyeniran C, Breuiller-Fouche M. Endothelin-1: physiological and pathological roles in myometrium. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:299-302.
4. Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci* 2014.
5. Kohan DE, Inscho EW, Wesson D, Pollock DM. Physiology of endothelin and the kidney. *Compr Physiol* 2011; 1:883-919.
6. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension* 2008; 52:452-9.
7. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:637-51.
8. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:110-6.
9. Carducci MA, Jimeno A. Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6296s-300s.
10. Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:2003-11.
11. Yohn JJ, Smith C, Stevens T, Hoffman TA, Morelli JG, Hurt DL, Yanagisawa M, Kane MA, Zamora MR. Human melanoma cells express functional endothelin-1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201:449-57.
12. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; 406:536-40.
13. Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 2001; 438:485-91.
14. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009; 27:3-9.
15. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009; 374:362-5.
16. Ponti G, Ruini C, Girolomoni G, Pellacani G, Farnetani F, Pastorino L, Ghiorzo P, Witkowski AM, Bianchi-Scarra G, Tomasi A, et al. Brooke-Spiegler syndrome tumor spectrum beyond the skin: a patient carrying germline R936X CYLD mutation and a somatic CYLD mutation in Brenner tumor. *Future Oncol* 2014; 10:345-50.
17. Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, Luis E, Tien J, Firestein R, Polakis P. An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17:965-75.
18. Spinella F, Caprara V, Di Castro V, Rosano L, Cianfrocca R, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91:395-405.

19. Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11496-500.
20. Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* 2004; 64:1436-43.
21. Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 2005; 49:173-80.
22. Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, Millward M, Trotter JM, Wyld DK, Kusic R, Shreeniwas R, Morganti A, Ballmer A, et al. A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 2007; 25:247-52.
23. Kefford RF, Clingan PR, Brady B, Ballmer A, Morganti A, Hersey P. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer* 2010; 9:69.
24. Recondo G, Diaz Canton E, de la Vega M, Greco M, Valsecchi ME. Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions. *World J Clin Oncol* 2014; 5:440-54.
25. Allard B, Wijkhuisen A, Borruil A, Deshayes F, Priam F, Lamourette P, Ducancel F, Boquet D, Couraud JY. Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor. *MAbs* 2013; 5:56-69.
26. Raymond MN, Robin P, De Zen F, Vilain G, Tanfin Z. Differential endothelin receptor expression and function in rat myometrial cells and leiomyoma ELT3 cells. *Endocrinology* 2009; 150:4766-76.
27. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Papsdorf G, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W. Evidence for downregulation of the endothelin-B-receptor by the use of fluorescent endothelin-1 and a fusion protein consisting of the endothelin-B-receptor and the green fluorescent protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S44-7.
28. Bremnes T, Paasche JD, Mehluum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275:17596-604.
29. Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 1999; 93:3678-84.
30. Russo A, Ficili B, Candido S, Pezzino FM, Guarneri C, Biondi A, Travali S, McCubrey JA, Spandidos DA, Libra M. Emerging targeted therapies for melanoma treatment (review). *Int J Oncol* 2014; 45:516-24.
31. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515:568-71.
32. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014; 32:1020-30.
33. Cruz-Munoz W, Jaramillo ML, Man S, Xu P, Banville M, Collins C, Nantel A, Francia G, Morgan SS, Cranmer LD, et al. Roles for endothelin receptor B and BCL2A1 in spontaneous CNS metastasis of melanoma. *Cancer Res* 2012; 72:4909-19.
34. Rosano L, Spinella F, Genovesi G, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-B receptor blockade inhibits molecular effectors of melanoma cell progression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S136-9.

35. Spinella F, Caprara V, Cianfrocca R, Rosano L, Di Castro V, Garrafa E, Natali PG, Bagnato A. The interplay between hypoxia, endothelial and melanoma cells regulates vascularization and cell motility through endothelin-1 and vascular endothelial growth factor. *Carcinogenesis* 2014; 35:840-8.
36. Berger Y, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L. Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:1111-9.
37. Ruf P, Gires O, Jager M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* 2007; 97:315-21.
38. Daumer MP, Schneider B, Giesen DM, Aziz S, Kaiser R, Kupfer B, Schneeweis KE, Schneider-Mergener J, Reineke U, Matz B, et al. Characterisation of the epitope for a herpes simplex virus glycoprotein B-specific monoclonal antibody with high protective capacity. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200:85-97.
39. Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2012; 84:147-62.
40. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyooka T, Masaki T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J Biol Chem* 1993; 268:8547-53.
41. Lattig J, Oksche A, Beyermann M, Rosenthal W, Krause G. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J Pept Sci* 2009; 15:479-91.
42. Doi T, Hiroaki Y, Arimoto I, Fujiyoshi Y, Okamoto T, Satoh M, Furuichi Y. Characterization of human endothelin B receptor and mutant receptors expressed in insect cells. *Eur J Biochem* 1997; 248:139-48.
43. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* 2014; 14:525-46.
44. Akiyama N, Hiraoka O, Fujii Y, Terashima H, Satoh M, Wada K, Furuichi Y. Biotin derivatives of endothelin: utilization for affinity purification of endothelin receptor. *Protein Expr Purif* 1992; 3:427-33.
45. Grantcharova E, Furkert J, Reusch HP, Krell HW, Papsdorf G, Beyermann M, Schulein R, Rosenthal W, Oksche A. The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem* 2002; 277:43933-41.
46. Tang L, Su M, Zhang Y, Ip W, Martinka M, Huang C, Zhou Y. Endothelin-3 is produced by metastatic melanoma cells and promotes melanoma cell survival. *J Cutan Med Surg* 2008; 12:64-70.
47. Lin N, Huang C, Tian J, Tao J, Zhang J, Yang L, Li Y, Liu Y, Chen S, Shen G, et al. The expression of endothelin receptor B in melanoma cells A375 and Sk-mel-1 and the proliferative effects of endothelin 3 on A375 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27:611-3.
48. Asundi J, Lacap JA, Clark S, Nannini M, Roth L, Polakis P. MAPK pathway inhibition enhances the efficacy of an anti-endothelin B receptor drug conjugate by inducing target expression in melanoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13:1599-610.
49. Kenakin T. A holistic view of GPCR signaling. *Nat Biotechnol* 2010; 28:928-9.
50. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47:1-51.
51. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:205-16.
52. Yu J, Taylor L, Mierke D, Berg E, Shia M, Fishman J, Sallum C, Polgar P. Limiting angiotensin II signaling with a cell-penetrating peptide mimicking the second intracellular loop of the angiotensin II type-I receptor. *Chem Biol Drug Des* 2010; 76:70-6.

53. Ahn KH, Mahmoud MM, Kendall DA. Allosteric modulator ORG27569 induces CB1 cannabinoid receptor high affinity agonist binding state, receptor internalization, and Gi protein-independent ERK1/2 kinase activation. *J Biol Chem* 2012; 287:12070-82.
54. Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuisen A, Couraud JY. Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biol* 2011; 30:727-37.
55. Laune D, Molina F, Ferrieres G, Villard S, Bes C, Rieunier F, Chardes T, Granier C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* 2002; 267:53-70.

D. Conclusion et perspectives de l'article sur le rendomab-B4

ET_BR est un RCPG très largement étudié pour son implication dans la progression tumorale, aussi bien pour ses actions sur les cellules cancéreuses elles-mêmes que sur le stroma tumoral²⁵³. Au sein du laboratoire a été produit et caractérisé un premier AcM dirigé contre ET_BR, le rendomab-B1. Le fait que cet Ac soit un antagoniste puissant du récepteur et qu'il reconnaisse des cellules endothéliales (lignée HUVEC) ouvre des perspectives d'application quant à l'infiltration tumorale lymphocytaire^{321, 551}. Cependant, le rendomab-B1 est incapable de reconnaître le récepteur exprimé à la surface des cellules de mélanome, ce qui écarte toute possibilité d'utilisation de cet Ac à des fins de ciblage tumoral diagnostique ou thérapeutique. C'est dans ce contexte que le rendomab-B4 a été sélectionné pour sa reconnaissance de différentes lignées de mélanomes.

A l'inverse du rendomab-B1, le rendomab-B4 ne reconnaît pas le récepteur exprimé à la surface de la lignée de cellules endothéliales que nous avons utilisée, ce qui vient renforcer l'hypothèse formulée lors de l'étude du rendomab-B1, selon laquelle il existerait différentes formes d'ET_BR. Le récepteur exprimé à la surface des cellules cancéreuses présenterait des particularités structurales permettant la liaison spécifique du rendomab-B4, mais pas celle du rendomab-B1.

Comme représenté dans la **figure 50**, selon les expériences de *pepscan* que nous avons réalisées, les épitopes conformationnels reconnus par le rendomab-B1 et le rendomab-B4 sont différents et mettent en jeu des séquences peptidiques partiellement distinctes : le premier serait constitué de trois fragments peptidiques, deux dans la partie N-terminale et un dans la boucle E2 ; le second impliquerait deux autres zones de la partie N-terminale du récepteur. Ces différences de sites de liaison pourraient expliquer la reconnaissance spécifique d'une forme saine ou cancéreuse du récepteur.

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées récemment afin de mieux caractériser les contributions respectives des deux séquences épitopiques déterminées en *pepscan*, qui constituent l'épitope conformationnel reconnu par le rendomab-B4. Elles ont consisté à substituer chacune de ces séquences du récepteur humain par les séquences correspondantes du récepteur murin (**Figure 51**), récepteur non reconnu par le rendomab-B4. Les alignements des séquences protéiques des parties N-terminales des récepteurs humain, de souris et de rat sont

présentés dans la **figure 51**. Comme on peut le voir, il existe des variations de séquence entre la protéine humaine et la protéine murine, au niveau des épitopes (3 a.a. différents sur 11 pour le premier épitope et 3 a.a. sur 8 pour le second), qui, d'après les expériences de *pepscan*, sont impliqués dans la liaison du rendomab-B4 à ET_BR. Cette observation a conduit à la substitution qui a été réalisée, afin de préciser la contribution de chacune de ces séquences dans la liaison de l'Ac au récepteur. Les résultats préliminaires d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence que la séquence épitopique la plus N-terminale est indispensable pour la liaison du rendomab-B4 à ET_BR, alors que la seconde séquence n'est pas requise, du moins dans les conditions testées. Pour compléter cette caractérisation, il faudrait déterminer l'affinité relative du rendomab-B4 pour ces différentes formes mutées d'ET_BR. Il a été décrit que, dans certaines conditions, ET_BR peut être protéolysé entre les résidus R64 et S65⁸¹ ce qui entraînerait la perte de la première séquence épitopique et, par voie de conséquence, réduirait la liaison du rendomab-B4. Il serait donc intéressant de déterminer si la forme tronquée du récepteur est présente dans les différentes lignées que nous avons utilisées et, le cas échéant, déterminer la proportion de forme tronquée dans chaque lignée.

Par ailleurs, comme cela a été évoqué dans l'article, toute autre modification post-traductionnelle d'ET_BR, spécifique d'un type cellulaire, pourrait modifier la reconnaissance du récepteur par l'Ac. Il n'est pas non plus exclu que la liaison de l'Ac dépende du contexte membranaire : la formation de dimères de récepteurs ou leur interaction avec d'autres protéines spécifiques de certains types cellulaires pourraient conduire à un masquage de l'épitope.

Le rendomab-B1 entrant en compétition avec l'ET sur le récepteur, les résultats de *pepscan* apportent des informations supplémentaires sur les a.a. mis en jeu dans la liaison de l'ET. Réciproquement, la **figure 50** met en évidence que certains a.a., qui, selon la littérature seraient impliqués dans la liaison de l'ET, se retrouveraient masqués par l'Ac ; ceci vient appuyer l'hypothèse selon laquelle le rendomab-B1, à l'inverse du rendomab-B4, reconnaîtrait au moins en partie le site de liaison de l'ET sur le récepteur.

Le travail que nous présentons dans ce premier article décrivant le rendomab-B4 est axé sur la caractérisation pharmacologique et moléculaire *in vitro* de l'Ac. Ces étapes préliminaires sont incontournables en vue d'une utilisation de l'Ac en oncologie, que ce soit dans le cadre d'une utilisation en diagnostic ou en thérapie anticancéreuse. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la

reconnaissance d'ET_BR surexprimé dans le cas du mélanome^{315, 536, 537}, cancer dans lequel l'implication du récepteur a été très largement étudiée et décrite^{258, 259}. L'axe endothéline, et plus particulièrement ET_BR, semble également jouer un rôle dans différents types de tumeurs du cerveau^{273, 552}. ET_BR serait un marqueur de mauvais pronostic pour les gliomes de haut grade⁵⁵³. De plus, il a récemment été montré, par des tests de migration semblables à ceux que nous avons utilisés (Fig. 8 de l'article), que l'ET-1 exogène induisait la migration d'une lignée humaine de glioblastome⁵⁵⁴. Pour ces raisons, ce type de lignées serait un outil supplémentaire pour la caractérisation du rendomab-B4.

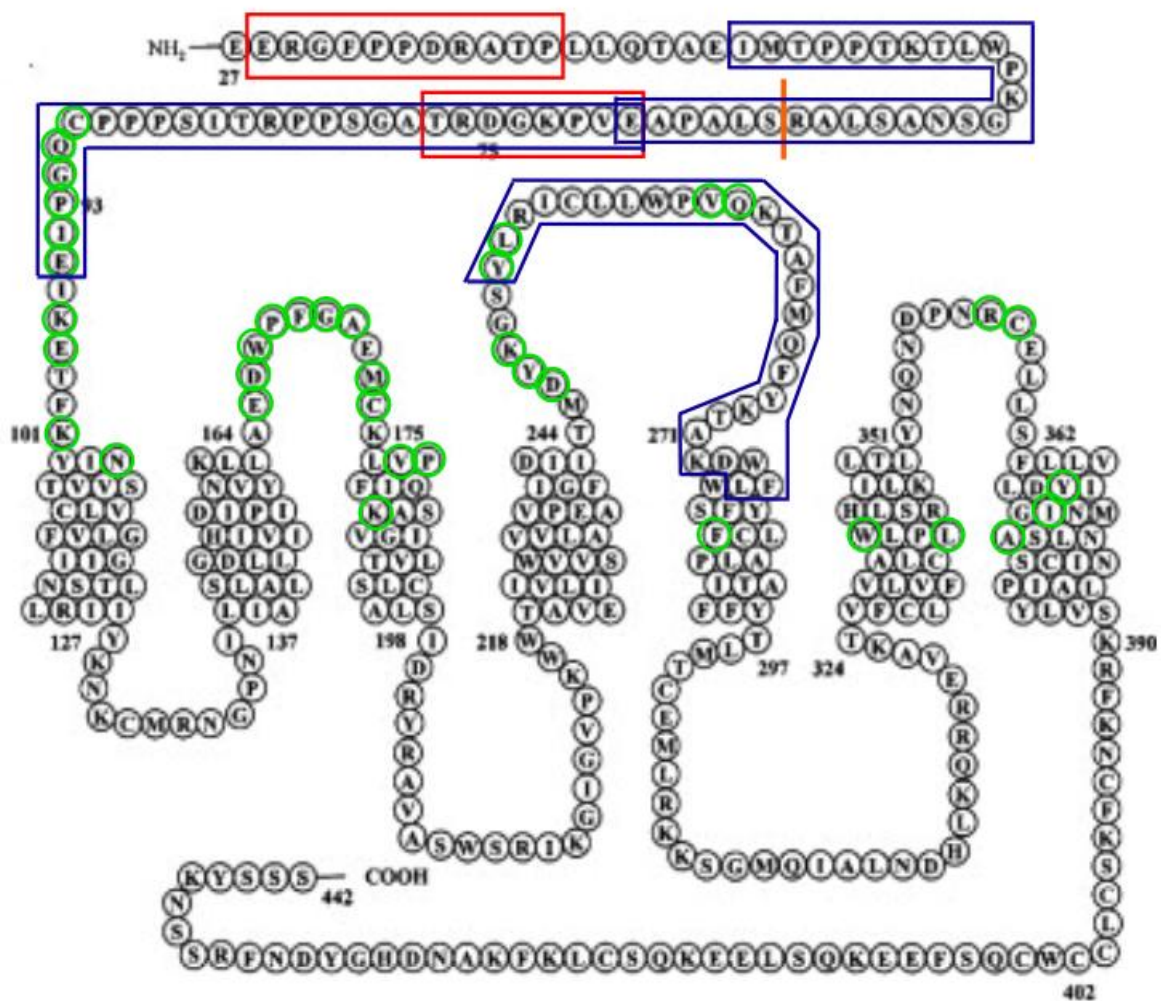


Figure 50. Représentation des sites de liaison supposés de l'ET, du rendomab-B1 et du rendomab-B4 sur ET_BR. Les acides aminés entourés en vert interviennent dans la liaison de l'ET-1 au récepteur (d'après Sakmoto *et al.*, 1993⁵⁵⁵, Lättig *et al.*, 2009¹⁹ et Mazzuca et Khalil, 2012⁶²). Les séquences peptidiques, déterminées par les expériences de *pepscan*, formant les épitopes du rendomab-B1 et du rendomab-B4 sont entourées en bleu et rouge, respectivement. Le trait orange symbolise le site de protéolyse du récepteur⁸¹.

Forts des résultats que nous avons obtenus *in vitro*, nous pourrions approfondir la caractérisation du rendomab-B4 *in vivo*, chez le petit animal. En effet, nous exposons dans cet article le fait que le rendomab-B4 inhibe la migration induite par l'ET-1 de la lignée de mélanome UACC-257. L'étude de l'effet du rendomab-B4 sur un modèle de métastase pulmonaire chez la souris⁵⁵⁶ viendrait donc judicieusement compléter nos résultats. Bien que nous ayons fait le choix d'approfondir la caractérisation du rendomab-B4 en utilisant les cellules UACC-257, en raison de leur plus grand nombre de récepteurs exprimés à leur surface⁴⁶⁴, nous avons montré (Fig. 5 de l'article) que le rendomab-B4 était également capable de se lier spécifiquement aux cellules SLM8, lignée de mélanome dérivée de métastase de ganglion lymphatique. Cette étude de l'implication d'ET_BR dans la métastase du mélanome pourrait donc être réalisée avec les cellules SLM8.

L'effet de l'Ac sur la croissance tumorale pourrait également faire l'objet d'une étude. Cependant, cette étude ne permettrait très probablement pas d'étudier les possibles effets secondaires de l'Ac à l'échelle d'un organisme. Effectivement, le rendomab-B4 ne se lie pas à la lignée ELT-3, cellules de léiomyome de rate⁴⁹⁸ qui expriment les récepteurs ET_AR et ET_BR, il est donc peu probable qu'il reconnaisse ET_BR exprimé chez la souris, les récepteurs du rat et de la souris étant très proches (**Figure 51**). Ceci est d'autant plus prévisible que les Ac que nous étudions ont été générés chez la souris. Cependant, puisque le rendomab-B4 semble reconnaître de façon spécifique des lignées cancéreuses, ce type d'étude *in vivo*, chez la souris, n'est pas exclu.

Comme cela a été proposé dans les perspectives de caractérisation des Ac dirigés contre ET_AR, il serait intéressant d'étudier ici la liaison du rendomab-B4 sur des coupes de mélanome humain. Cette approche histologique serait un moyen de confirmer la spécificité de reconnaissance de la forme tumorale du récepteur. De plus, l'absence de marquage du rendomab-B4 sur d'autres structures que la tumeur elle-même, comme des capillaires présents dans les couches plus profondes de la peau, serait un premier argument laissant penser que l'Ac ne générerait que peu d'effets secondaires. Une colocalisation exclusive du marquage du rendomab-B4 et de celui d'Ac dirigés contre des marqueurs de mélanome, comme HMB-45 ou Melan-A⁵⁵⁷, viendrait renforcer ces arguments.

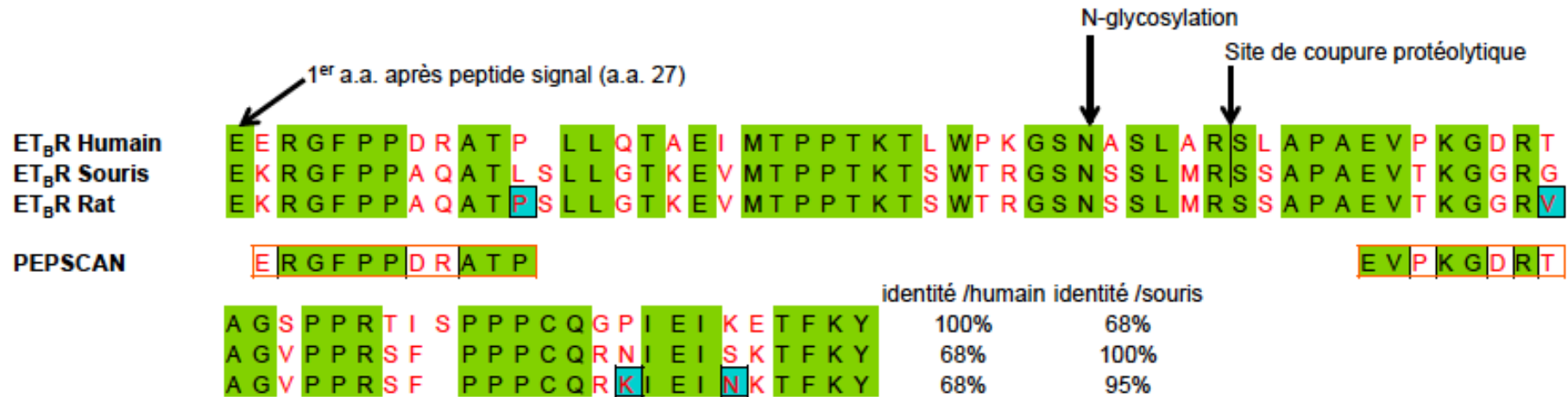


Figure 51. Alignement des séquences d'ET_BR humain et murins. Les séquences protéiques de la partie N-terminale des récepteurs ET_B humain, de souris et de rat ont été alignées (grâce au logiciel Multalin, (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>)). Sur fond vert figurent les acides aminés (a.a.) communs aux trois espèces. En rouge figurent les a.a. qui diffèrent entre l'espèce humaine et les récepteurs murins. Les a.a. de la séquence de la protéine de rat différant de ceux de la protéine de souris sont indiqués sur fond bleu. Les épitopes reconnus par le rendomab-B4, déterminés en *pepscan*, sont entourés en orange (ligne PEPSCAN). Les sites de glycosylation et de protéolyse sont indiqués par des flèches. Les identités de séquences par rapport au récepteur humain (identité /humain) et au récepteur de souris (identité /souris) ont été calculées. Les pourcentages d'identité de chaque séquence par rapport à la séquence humaine et à la séquence de souris sont indiqués en fin de ligne.

DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION

Parmi les 370 RCPG non-olfactifs recensés, seule une soixantaine d'entre eux font l'objet d'un ciblage par de petites molécules thérapeutiques. Ils pourraient pourtant être beaucoup plus nombreux, puisqu'environ 100 RCPG supplémentaires sont connus pour être impliqués dans diverses maladies⁴⁶². Malgré tout, représentant un quart du marché du médicament, les molécules dirigées contre les RCPG occupent une place non négligeable dans l'industrie pharmaceutique⁴⁶². Bien qu'en théorie les AcM soient un moyen efficace de cibler les RCPG, notamment en raison de leur grande spécificité pour des cibles extrêmement variées, dans les faits, le ciblage thérapeutique des RCPG par les AcM est bien en deçà de son potentiel et les AcM anti-RCPG sont très loin de représenter un quart des IgG du marché pharmaceutique. Depuis 2010, ce ne sont pas moins de quinze AcM qui ont été mis sur le marché, en très grande partie dans le cadre d'une utilisation thérapeutique anti-cancéreuse. Parmi les AcM commercialisés à l'heure actuelle, un seul est dirigé contre une cible de la grande famille des RCPG : il s'agit du mogamulizumab, un AcM dirigé contre le récepteur de chimiokine CCR4, qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché au Japon, en 2012, pour le traitement du lymphome ou la leucémie à cellules T de l'adulte.

Pourtant, de nombreuses études ont pu mettre en évidence l'implication des RCPG en oncologie, soutenant l'intérêt d'un ciblage de ces molécules membranaires par des AcM^{462, 558}. Parmi ces RCPG figurent les deux récepteurs des ET, ET_{AR} et ET_{BR}, dont il est très largement admis qu'ils jouent un rôle prédominant dans la progression de nombreux cancers, de par leur surexpression à la surface des cellules tumorales, mais aussi de par leur action sur le stroma tumoral. En effet, ET_{AR} et ET_{BR} sont fortement exprimés par les cellules cancéreuses et remplissent des rôles fonctionnels importants pour le développement de la tumeur²⁵³ (ce qui les rend moins sujets à une perte d'expression). Ces récepteurs constituent donc des cibles thérapeutiques/diagnostiques pertinentes au sein de la tumeur.

L'absence étonnante d'AcM ciblant des RCPG peut s'expliquer par les difficultés inhérentes à leur obtention. En effet, en raison du contexte membranaire et de la structure tridimensionnelle complexe des RCPG, la génération d'AcM anti-RCPG se trouve limitée par la disponibilité en Ag propre à l'immunisation. En réponse à ce

challenge technique, différents formats d'immunogène ont été envisagés, plus ou moins adaptés à la production d'AcM capables de cibler un RCPG *in vivo*. Ainsi, des AcM anti-RCPG ont été produits à partir d'immunisations basées sur des peptides, des cellules entières, des préparations de fractions membranaires, des protéines purifiées ou encore de l'ADN⁴⁶². Pour prétendre à une utilisation *in vivo* des Ac produits, l'immunogène doit se trouver sous une conformation tridimensionnelle stable, identique à celle de la protéine native. Il est en effet peu probable que des AcM obtenus par une immunisation peptidique soient à même de reconnaître le récepteur dans sa conformation native, leur réactivité étant bien souvent limitée au peptide utilisé. Lors de l'immunisation génique, l'Ag est produit chez l'hôte ; cette synthèse *in situ* permet d'obtenir le RCPG dans sa structure native, présentant des modifications post-traductionnelles et un repliement correct. Cette technique a également comme avantage de ne pas introduire d'Ag non pertinents qui pourraient entraîner une dilution de la réponse immunitaire spécifique anti-RCPG, comme c'est le cas lors d'une immunisation par fractions membranaires ou cellules entières. Seules les régions du RCPG présentes à la surface de la cellule, c'est à dire le domaine N-terminal et les boucles extra-cellulaires, sont susceptibles de constituer un épitope. A l'inverse de l'immunisation par protéines entières qui nécessite l'utilisation de détergents, pour purifier et maintenir le récepteur sous une conformation stable, ce qui peut entraîner un masquage des épitopes potentiels, l'immunisation par ADN permet de présenter un immunogène « nu » à la surface des cellules ayant reçu le plasmide codant pour l'ADNc d'intérêt.

Des efforts ont été réalisés afin d'optimiser l'immunisation génique : ils consistent d'une part à augmenter l'expression de l'Ag, en ayant recours à une optimisation des éléments transcriptionnels du plasmide et en améliorant la séquence du gène codant pour l'Ag ; d'autre part, ils visent à améliorer l'immunogénicité relativement faible des RCPG, en usant d'adjuvants divers (e.g. microsphères, polymères, mais aussi cytokines ou chimiokines) et en améliorant les méthodes d'administration de l'ADN (e.g. « *gene gun* », électroporation)⁴⁸⁵.

A. Fujimoto et ses collaborateurs ont élaboré une technique d'immunisation génique visant à augmenter l'immunogénicité des RCPG, et en particulier d'ET_AR. Des souris ont été immunisées avec un plasmide codant pour ET_AR fusionné en C-terminal à la protéine de choc thermique issue d'*Escherichia coli*, GroEL⁵⁵⁹. GroEL, une protéine chaperonne qui intervient dans le transport et le repliement des protéines, joue ici un

rôle de molécule immunostimulatrice et de « *carrier* ». Ce type d'immunisation a permis l'induction d'une importante réponse spécifique anti-ET_AR.

Le protocole que nous avons utilisé pour obtenir des AcM anti-ET_AR et anti-ET_BR repose sur une technique d'immunisation génique intramusculaire chez la souris, couplée à une électroporation, suivie de rappels cellulaires réalisés avec des HEK-293-T surexprimant le récepteur d'intérêt. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de confirmer que cette stratégie d'immunisation génique était une méthode efficace pour obtenir des Ac polyclonaux murins dirigés contre un RCPG donné. Consécutivement à une fusion cellulaire et grâce à un criblage original des surnageants d'hybridomes, par une technique d'ELISA sur cellules en suspension, des AcM ont été obtenus, ciblant spécifiquement le récepteur d'intérêt dans son contexte membranaire.

En raison de ses propriétés antagonistes, le rendomab-B1 est le premier anti-ET_BR produit au sein du laboratoire à avoir été caractérisé⁴⁶⁶. L'incapacité de cet AcM à lier le récepteur exprimé par des cellules cancéreuses nous a conduit à retenir d'autres AcM sur la base de leur reconnaissance d'ET_BR surexprimé à la surface de lignées de mélanomes. Parmi ces AcM aux propriétés de liaisons proches, c'est finalement le rendomab-B4, qui, compte tenu de son excellente affinité apparente et de son fort B_{max}, a fait l'objet d'une caractérisation plus aboutie.

Des expériences de cartographie d'épitope ont mis en évidence que le rendomab-B1 et le rendomab-B4 reconnaissent des régions différentes d'ET_BR, ce qui, mis en relation avec les propriétés pharmacologiques de ces AcM, a été une source d'informations concernant le site de liaison du ligand endogène. Au contraire, bien qu'ils aient été de natures isotypiques différentes, les épitopes reconnus par le rendomab-B4 et trois autres AcM reconnaissant ET_BR surexprimé par les mélanomes, se sont révélés strictement identiques. Ce résultat surprenant suggère que ces épitopes seraient immunodominants dans les conditions d'immunisation que nous avons appliquées. En revanche, il se pourrait que certaines zones extracellulaires du récepteur humain soient trop proches au niveau structural de celles du récepteur murin, les rendant peu ou pas immunogènes. Afin de tenter d'obtenir des AcM dirigés contre d'autres épitopes, donc ayant très probablement des propriétés pharmacologiques différentes, il pourrait être envisagé d'immuniser les souris en remplaçant les séquences immunodominantes du récepteur humain par les séquences du récepteur murin correspondant, le principal risque d'une telle approche étant de supprimer toute immunogénicité de la protéine. Bien qu'une

rupture de la tolérance du soi ait déjà été observée dans des protocoles d'immunisation⁵⁶⁰, l'homologie de séquence des récepteurs ET_BR humain et murin pourrait être une limitation à la production d'AcM dirigés contre des épitopes trop similaires.

Au vu des résultats qui ont été obtenus, il serait possible d'optimiser d'une part le protocole d'immunisation génique adopté, et d'autre part le criblage en ELISA sur cellules, afin d'orienter la production d'AcM vers des anti-ET_BR qui soient spécifiques d'une forme cancéreuse du récepteur. Il serait en effet envisageable de réaliser les rappels cellulaires à l'aide de lignées cancéreuses surexprimant ET_BR. Par ailleurs, le criblage des surnageants d'hybridomes pourrait également être réalisé sur des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur. Dans ce cas, le meilleur moyen de s'assurer de la spécificité anti-ET_BR des AcM criblés serait certainement d'inhiber la synthèse du récepteur par l'intermédiaire de siRNA. La liaison des AcM retenus serait par la suite testée en cytométrie en flux sur des lignées saines exprimant le récepteur.

Les connaissances sur la structure (voir plus loin) et les fonctions physiologiques des RCPG ont changé les approches adoptées dans le développement de médicaments. Dans un premier temps, les efforts se sont concentrés sur le développement de petites molécules thérapeutiques ciblant les sites de fixation orthostériques des RCPG, où se lie le ligand endogène, donnant naissance à des molécules agonistes, activant le RCPG, ou à des molécules antagonistes, bloquant les actions du ligand endogène. Ces sites orthostériques sont particulièrement bien conservés d'un point de vue structural et évolutif entre les membres d'une même sous-famille. Par ailleurs, le développement de nouvelles molécules pharmacologiques a permis de mettre en évidence l'existence de sites de régulation allostérique des RCPG. Ces sites allostériques des RCPG sont au contraire moins bien définis et moins conservés ; les molécules dirigées contre ces derniers ont ainsi une meilleure sélectivité. Les ligands allostériques agissent en induisant un changement de conformation du RCPG, transmis au niveau du site orthostérique ou des sites de couplage des protéines effectrices, impactant de ce fait la signalisation en aval du récepteur⁵⁶¹. En effet, les progrès réalisés en cristallographie à rayon X ont permis de mettre en évidence des changements de conformation de la structure extracellulaire des RCPG en réponse à la fixation de différents ligands, y compris des fragments d'AcM. Le ligand allostérique peut induire une signalisation biaisée du ligand orthostérique en stabilisant le RCPG dans une conformation particulière associée à l'activation de certaines voies de signalisation⁵⁶¹ : la co-liaison du modulateur et du

ligand orthostérique entraîne une modulation sélective du profil de signalisation du RCPG. Contrairement à des inhibiteurs orthostériques, les inhibiteurs allostériques sont donc dépourvus d'efficacité intrinsèque et n'exercent leur action qu'en présence de l'agoniste endogène, ce qui limite les effets indésirables liés à la cible. Aujourd'hui plus attractive, la stratégie de ciblage des sites allostériques ne se limite pas aux RCPG : parmi les petites molécules récemment développées on peut citer un inhibiteur allostérique dirigé contre le récepteur du FGF⁵⁶².

Les résultats que nous avons obtenus montrent : 1) que le rendomab-B4 se fixe en un site différent du site de liaison de l'ET sur ET_BR ; 2) que seul, il n'exerce pas d'effet sur la signalisation du récepteur ; 3) qu'en présence d'ET il inhibe une partie de la signalisation du RCPG. A ce titre, le rendomab-B4 se comporte comme un inhibiteur allostérique induisant une signalisation biaisée d'ET_BR. La liaison du rendomab-B4 entraînerait un changement de conformation d'ET_BR provoquant une modulation de la signalisation du récepteur induite par la fixation de son ligand endogène. Nous avons observé une inhibition, possiblement biaisée, de notre AcM sur la lignée de mélanome UACC-257 : alors que l'activation de la voie ERK1/2 ne semble pas impactée par la liaison de l'AcM, ce dernier inhibe l'activation de la voie PLC par ET-1 et ET-3. Une modification du recrutement des protéines G et/ou de la β -arrestine pourrait être une explication à ce mécanisme. Nos observations ouvrent de nouvelles perspectives à l'utilisation des AcM puisqu'ils pourraient permettre l'inhibition spécifique de certains effets cellulaires de leur cible. Les avantages thérapeutiques d'un AcM comme le rendomab-B4 sont multiples. Cet AcM semble se lier sélectivement à une forme d'ET_BR spécifiquement exprimée dans les cellules de mélanome, son effet devrait donc se limiter à la tumeur. Cette propriété est un point crucial : en effet, une des limitations majeures à l'utilisation de molécules thérapeutiques orthostériques, dirigées contre des RCPG à large profil d'expression, est que ces molécules, qui ne ciblent pas spécifiquement la tumeur, exercent de nombreux effets, souvent délétères, sur les tissus sains. De plus s'il est confirmé que le rendomab-B4 est bien un inhibiteur allostérique, il n'exercerait donc son action qu'en présence du ligand endogène. Contrairement à un AcM dépourvu d'action directe sur le récepteur⁴⁶⁴ qui doit être couplé à une molécule cytotoxique ou un radioélément, le rendomab-B4 n'agit que sur les cellules dont le récepteur est activé par le ligand. Ces caractéristiques présagent une limitation certaine des effets délétères potentiels liés à son utilisation thérapeutique.

Les AcM utilisés en oncologie sont à l'heure actuellement couramment combinés à des chimiothérapies. Il a plus récemment été mis en évidence que l'utilisation conjointe d'AcM dirigés contre la même cible pouvait augmenter l'effet anticancéreux de ces molécules. Une étude a notamment été menée avec deux AcM anti-HER-2, le trastuzumab et le pertuzumab, ce dernier se liant à un épitope différent de celui reconnu par le trastuzumab. L'effet de ces AcM a été étudié sur deux modèles de xénogreffe, l'un de cancer du sein HER-2-positif, l'autre de cancer du poumon non à petites cellules. La combinaison de ces deux AcM a permis une augmentation importante de leur effet anti-tumoral et a induit une régression des deux types de tumeurs humaines implantées chez l'animal⁴¹⁸. L'objectif de l'essai clinique de phase III CLEOPATRA (pour *CLinical Evaluation Of Pertuzumab And TRAstuzumab*), encore en cours, est d'évaluer l'efficacité de l'addition du pertuzumab, chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique surexprimant HER-2, à la bithérapie de référence trastuzumab + docetaxel⁴¹⁹. Cette approche thérapeutique s'est montrée judicieuse puisque le groupe de patientes ayant reçu le pertuzumab en plus du trastuzumab et du docetaxel présenterait une augmentation de plus de 15 mois de la survie médiane globale⁵⁶³. Cet essai démontre tout l'intérêt qu'il y aurait à combiner certains des anti-ET_BR que nous avons obtenus et d'en étudier l'efficacité, sous réserve qu'ils reconnaissent des épitopes distincts du récepteur exprimé par les cellules cancéreuses.

Outre leur utilisation thérapeutique qui a révolutionné le marché du médicament, les AcM se prêtent également à une utilisation diagnostique, non invasive, en imagerie. Grâce à des techniques enzymatiques et d'ingénierie, des fragments d'Ac ont pu être obtenus : ceci a permis de modifier les propriétés des AcM et ainsi d'optimiser ces molécules pour une utilisation diagnostique (**Figure 52**). Effectivement, certaines caractéristiques sont favorables à une utilisation en imagerie, telles qu'une faible immunogénicité (humanisation ou Ac humains) permettant d'administrer des doses répétées, une cinétique rapide (à la fois en terme de ciblage et de clairance), ou encore un faible poids moléculaire favorisant une meilleure pénétration des tissus⁵⁶⁴.







						
Format (poids moléculaire)	Ac intact (150 kDa)	F(ab') ₂ (120 kDa)	Minibody (80 kDa)	Diabody (55 kDa)	Fab (55 kDa)	scFv (25 kDa)
Source		enzymatique	ingénierie	ingénierie	enzymatique	ingénierie
Valence	bivalent	bivalent	bivalent	bivalent	monovalent	monovalent
Voie d'élimination	foie	foie, reins	foie	reins	reins	reins
Site de conjugaison	charnière, ponts disulfures	charnière, ponts disulfures	charnière, C-terminal	C-terminal	C-terminal	C-terminal

Figure 52 : Aperçu des principales caractéristiques des différents formats d'Ac.
D'après Wu, 2014⁵⁶⁴.

Selon qu'ils interagissent avec des ligands agonistes, antagonistes, des molécules inhibitrices ou encore divers effecteurs, les RCPG adoptent des conformations différentes⁵⁶⁵. Outre leur contexte membranaire, la nature très dynamique de ces molécules, rend leur caractérisation structurale particulièrement complexe. Effectivement, il n'existe encore qu'un nombre réduit de RCPG dont la structure tridimensionnelle ait été déterminée. Pour la première fois en 2000, la structure à haute résolution de la rhodopsine a été obtenue par cristallographie à rayons X⁵⁶⁶. Pas moins de sept années supplémentaires ont été nécessaires à la publication de la structure d'un deuxième RCPG, le récepteur $\beta 2$ adrénergique ($\beta 2AR$)^{567, 568}. Depuis, on a pu assister à une véritable explosion du nombre de structures de RCPG résolues, dans différentes conformations, avec divers ligands. Récemment, c'est la structure du $\beta 2AR$ en interaction avec la protéine G_s qui a été établie⁵⁶⁹. Un effort considérable est actuellement réalisé dans le but de déterminer la structure de nombreux RCPG (<http://gpcr.scripps.edu/>). L'étude de la structure de récepteurs membranaires par cristallographie a été rendue possible grâce à différentes approches méthodologiques consistant d'une part à réduire la flexibilité conformationnelle et d'autre part à augmenter la stabilité des RCPG, afin de déterminer leur structure cristallographique à haute résolution ; l'utilisation de fragments d'Ac fait partie de ces techniques. Parce qu'ils sont dépourvus de région charnière flexible, les fragments Fab sont en effet préférés aux Ac entiers en cristallographie. Ces fragments d'Ac facilitent la cristallisation des RCPG en augmentant la taille du domaine soluble du récepteur et en le stabilisant dans une conformation spécifique (**Figure 53**). Par exemple, la première structure du $\beta 2AR$ a été déterminée grâce à un Fab se liant à la boucle I3 du récepteur⁵⁶⁷ : ces travaux précurseurs ont permis d'obtenir des informations sur la

structure globale du récepteur. Les nanobodies, fragments d'Ac de camélidés (dont la particularité est de n'être constitués que de chaînes lourdes) sont également des formats utilisés en cristallographie et sont appréciés pour leur grande stabilité⁵⁷⁰. En plus des indications qu'ils apportent concernant le site de liaison des ligands naturels (expériences de compétition et cartographie d'épitopes), les AcM anti-ET_AR et anti-ET_BR que nous avons obtenus pourraient donc apporter leur contribution dans la détermination de la structure tridimensionnelle de ces récepteurs.

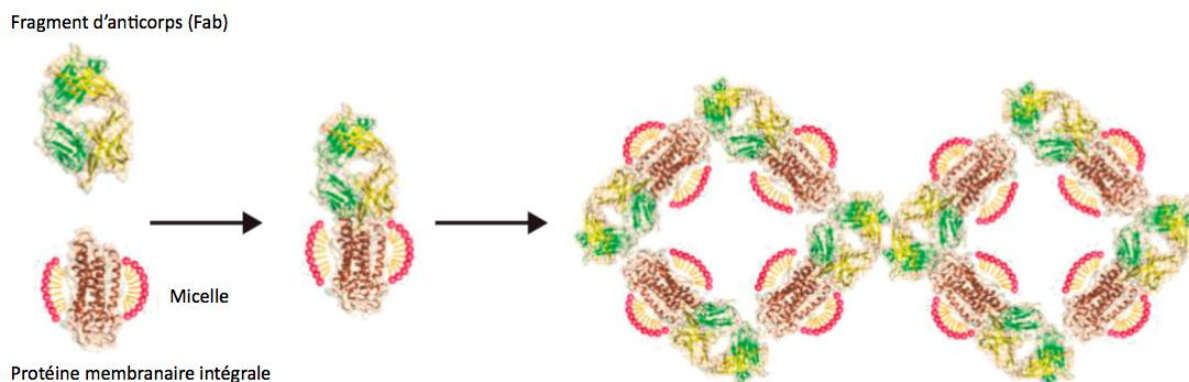


Figure 53 : Représentation schématique d'une co-cristallisation de protéine membranaire intégrale avec des fragments d'anticorps. En augmentant la surface polaire de la protéine membranaire étudiée, les fragments Fab d'AcM de souris en facilitent la cristallisation. D'après Hino *et al.*, 2013⁵⁷¹.

BIBLIOGRAPHIE

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:9265-9.
3. De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222:166-73.
4. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a Coronary Vasoconstrictor Produced by Cultured Endothelial-Cells. *American Journal of Physiology* 1985; 248:C550-C6.
5. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364:45-56.
6. O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 1987; 132:263-70.
7. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.
8. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2863-7.
9. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10:374-8.
10. Kochva E, Viljoen CC, Botes DP. A new type of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (Atractaspidinae). *Toxicon* 1982; 20:581-92.
11. Takasaki C, Tamiya N, Bdolah A, Wollberg Z, Kochva E. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon* 1988; 26:543-8.
12. Ducancel F. The sarafotoxins. *Toxicon* 2002; 40:1541-5.
13. Hillier C, Petrie MC, Love MP, Johnston F, MacLean MR, McMurray JJ. Effect of adrenomedullin on the production of endothelin-1 and on its vasoconstrictor action in resistance arteries: evidence for a receptor-specific functional interaction in patients with heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101:45-51.
14. Maguire JJ, Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol* 2002; 137:579-88.
15. Tamaoki H, Kobayashi Y, Nishimura S, Ohkubo T, Kyogoku Y, Nakajima K, Kumagaye S, Kimura T, Sakakibara S. Solution conformation of endothelin determined by means of ¹H-NMR spectroscopy and distance geometry calculations. *Protein Eng* 1991; 4:509-18.
16. Janes RW, Peapus DH, Wallace BA. The crystal structure of human endothelin. *Nat Struct Biol* 1994; 1:311-9.
17. Atkins AR, Martin RC, Smith R. ¹H NMR studies of sarafotoxin SRTb, a nonselective endothelin receptor agonist, and IRL 1620, an ETB receptor-specific agonist. *Biochemistry* 1995; 34:2026-33.
18. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156:1182-6.

19. Lattig J, Oksche A, Beyermann M, Rosenthal W, Krause G. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J Pept Sci* 2009; 15:479-91.
20. Khimji AK, Rockey DC. Endothelin--biology and disease. *Cell Signal* 2010; 22:1615-25.
21. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 1990; 172:1741-8.
22. Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:823-30.
23. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kanazawa I. Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:587-93.
24. Takahashi K, Ghatei MA, Jones PM, Murphy JK, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S101-3.
25. Giaid A, Gibson SJ, Herrero MT, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, Masaki T, Ibrahim NB, Roberts GW, Rossi ML, et al. Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain. *Histochemistry* 1991; 95:303-14.
26. Ortmann J, Nett PC, Celeiro J, Traupe T, Tornillo L, Hofmann-Lehmann R, Haas E, Frank B, Terraciano LM, Barton M. Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334:689-95.
27. Karet FE, Davenport AP. Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int* 1996; 49:382-7.
28. Predel HG, Meyer-Lehnert H, Backer A, Stelkens H, Kramer HJ. Plasma concentrations of endothelin in patients with abnormal vascular reactivity. Effects of ergometric exercise and acute saline loading. *Life Sci* 1990; 47:1837-43.
29. Nishikori K, Akiyama H, Inagaki Y, Ohta H, Kashiwabara T, Iwamatsu A, Nomizu M, Morita A. Receptor binding affinity and biological activity of C-terminal elongated forms of endothelin-1. *Neurochem Int* 1991; 18:535-9.
30. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78:473-85.
31. Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:18275-8.
32. Turner AJ, Murphy LJ. Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:91-102.
33. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270:15262-8.
34. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998; 428:304-8.
35. Wypij DM, Nichols JS, Novak PJ, Stacy DL, Berman J, Wiseman JS. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol* 1992; 43:845-53.

36. Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 1997; 159:1987-92.
37. Takai S, Shiota N, Jin D, Miyazaki M. Chymase processes big-endothelin-2 to endothelin-2-(1-31) that induces contractile responses in the isolated monkey trachea. *Eur J Pharmacol* 1998; 358:229-33.
38. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 2011; 25:16-28.
39. Doi Y, Kudo H, Nishino T, Yamamoto O, Nagata T, Nara S, Morita M, Fujimoto S. Enhanced expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in acute hypoxic rat aorta. *Histol Histopathol* 2002; 17:97-105.
40. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15:302-8.
41. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:16066-8.
42. Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6344-8.
43. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem* 2001; 276:12645-53.
44. Doi T, Sakoda T, Akagami T, Naka T, Mori Y, Tsujino T, Masuyama T, Ohyanagi M. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H1279-H87.
45. Strait KA, Stricklett PK, Kohan JL, Miller MB, Kohan DE. Calcium regulation of endothelin-1 synthesis in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F601-6.
46. Welch AK, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Early progress in epigenetic regulation of endothelin pathway genes. *Br J Pharmacol* 2013; 168:327-34.
47. Matteucci E, Maroni P, Bendinelli P, Locatelli A, Desiderio MA. Epigenetic control of endothelin-1 axis affects invasiveness of breast carcinoma cells with bone tropism. *Exp Cell Res* 2013; 319:1865-74.
48. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:859-64.
49. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 2000; 525 Pt 3:761-70.
50. Rubin SA, Levin ER. Clinical review 53: The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:6-10.
51. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; 265:14150-5.
52. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 1992; 20:89-95.
53. Seyrantepe V, Hinek A, Peng J, Fedjaev M, Ernest S, Kadota Y, Canuel M, Itoh K, Morales CR, Lavoie J, et al. Enzymatic activity of lysosomal carboxypeptidase (cathepsin) A is required for proper elastic fiber formation and inactivation of endothelin-1. *Circulation* 2008; 117:1973-81.

54. Pan X, Grigoryeva L, Seyrantepe V, Peng J, Kollmann K, Tremblay J, Lavoie JL, Hinek A, Lubke T, Pshezhetsky AV. Serine carboxypeptidase SCPEP1 and Cathepsin A play complementary roles in regulation of vasoconstriction via inactivation of endothelin-1. *PLoS Genet* 2014; 10:e1004146.
55. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996; 94:1578-84.
56. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:730-2.
57. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:732-5.
58. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268:19126-33.
59. Ruiz-Opazo N, Hirayama K, Akimoto K, Herrera VL. Molecular characterization of a dual endothelin-1/Angiotensin II receptor. *Mol Med* 1998; 4:96-108.
60. Lecoin L, Sakurai T, Ngo MT, Abe Y, Yanagisawa M, Le Douarin NM. Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3024-9.
61. Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br J Pharmacol* 1993; 110:777-82.
62. Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2012; 84:147-62.
63. Saito Y, Mizuno T, Itakura M, Suzuki Y, Ito T, Hagiwara H, Hirose S. Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites. *J Biol Chem* 1991; 266:23433-7.
64. Kochl R, Alken M, Rutz C, Krause G, Oksche A, Rosenthal W, Schulein R. The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 2002; 277:16131-8.
65. Ihara M, Fukuroda T, Saeki T, Nishikibe M, Kojiri K, Suda H, Yano M. An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178:132-7.
66. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* 1992; 50:247-55.
67. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4892-6.
68. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384:353-5.
69. Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM, Guise TA. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10954-9.
70. Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulous PB, Burnstock G, Taylor I. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer* 2001; 85:1759-63.

71. Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11496-500.
72. Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 2005; 49:173-80.
73. White DG, Cannon TR, Garratt H, Mundin JW, Sumner MJ, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S144-8.
74. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9797-800.
75. Hashido K, Gamou T, Adachi M, Tabuchi H, Watanabe T, Furuichi Y, Miyamoto C. Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ETA receptor abrogated the binding activity to ET-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1241-8.
76. Doi T, Hiroaki Y, Arimoto I, Fujiyoshi Y, Okamoto T, Satoh M, Furuichi Y. Characterization of human endothelin B receptor and mutant receptors expressed in insect cells. *Eur J Biochem* 1997; 248:139-48.
77. Horstmeyer A, Cramer H, Sauer T, Muller-Esterl W, Schroeder C. Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J Biol Chem* 1996; 271:20811-9.
78. Okamoto Y, Ninomiya H, Tanioka M, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J Biol Chem* 1997; 272:21589-96.
79. Stannard C, Lehenkari P, Godovac-Zimmermann J. Functional diversity of endothelin pathways in human lung fibroblasts may be based on structural diversity of the endothelin receptors. *Biochemistry* 2003; 42:13909-18.
80. Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Boning H, Breit A, Piiper A, Lundstrom K, Muller-Esterl W, Schroeder C. Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem* 2001; 268:5449-59.
81. Grantcharova E, Furkert J, Reusch HP, Krell HW, Papsdorf G, Beyermann M, Schulein R, Rosenthal W, Oksche A. The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem* 2002; 277:43933-41.
82. Proverbio D, Roos C, Beyermann M, Orban E, Dotsch V, Bernhard F. Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828:2182-92.
83. Ferre S, Casado V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin JP, Guitart X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev* 2014; 66:413-34.
84. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 2004; 279:27679-87.
85. Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S30-3.
86. Evans NJ, Walker JW. Sustained Ca²⁺ signaling and delayed internalization associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86:526-35.

87. Klammt C, Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F. Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. *Methods Mol Biol* 2007; 375:57-78.
88. Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22:207-26.
89. Klammt C, Srivastava A, Eifler N, Junge F, Beyermann M, Schwarz D, Michel H, Doetsch V, Bernhard F. Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J* 2007; 274:3257-69.
90. Yatawara A, Wilson JL, Taylor L, Polgar P, Mierke DF. C-terminus of ETA/ETB receptors regulate endothelin-1 signal transmission. *J Pept Sci* 2013; 19:257-62.
91. Yoon S, Zuccarello M, Rapoport RM. EndothelinA-endothelinB receptor cross-talk in rat basilar artery in situ. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012; 385:437-41.
92. Rapoport RM, Zuccarello M. Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross-talk and endothelin receptor binding. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63:1373-7.
93. Zhang Y, Fu C, Ren H, He D, Wang X, Asico LD, Jose PA, Zeng C. Impaired stimulatory effect of ETB receptor on D(3) receptor in immortalized renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34:75-82.
94. Zeng C, Hopfer U, Asico LD, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Altered AT1 receptor regulation of ETB receptors in renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2005; 46:926-31.
95. Boesen EI. Endothelin ETB receptor heterodimerization: beyond the ETA receptor. *Kidney Int* 2008; 74:693-4.
96. Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N, Miwa S, Masaki T. Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G proteins using a mutant endothelin(A) receptor. *Mol Pharmacol* 2002; 61:277-84.
97. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992; 267:12468-74.
98. Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J Biol Chem* 1995; 270:10072-8.
99. Doi T, Sugimoto H, Arimoto I, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y. Interactions of endothelin receptor subtypes A and B with Gi, Go, and Gq in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1999; 38:3090-9.
100. Imamura T, Huang J, Dalle S, Ugi S, Usui I, Luttrell LM, Miller WE, Lefkowitz RJ, Olefsky JM. beta -Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 2001; 276:43663-7.
101. Rosano L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, Salvati E, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:2806-11.
102. Tanfin Z, Leiber D, Robin P, Oyeniran C, Breuiller-Fouche M. Endothelin-1: physiological and pathological roles in myometrium. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:299-302.
103. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* 1990; 85:790-7.
104. Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303:260-6.

105. Bell RM, Hannun YA, Loomis CR. Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers. *Symp Fundam Cancer Res* 1986; 39:145-56.
106. Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264:8237-40.
107. Chua BH, Krebs CJ, Chua CC, Diglio CA. Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 262:E412-6.
108. Assender JW, Irenius E, Fredholm BB. Endothelin-1 causes a prolonged protein kinase C activation and acts as a co-mitogen in vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1996; 157:451-60.
109. Rosen B, Barg J, Zimlichman R. The effects of angiotensin II, endothelin-1, and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth muscle cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999; 12:1243-51.
110. McNair LL, Salamanca DA, Khalil RA. Endothelin-1 promotes Ca²⁺ antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction via activation of epsilon-protein kinase C. *Hypertension* 2004; 43:897-904.
111. Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, Suzuki N. Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem* 2011; 150:357-69.
112. Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal* 2013; 25:1955-61.
113. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:637-51.
114. Luscher TF, Yang Z, Kiowski W, Linder L, Dohi Y, Diederich D. Endothelin-induced vasoconstriction and calcium antagonists. *J Hum Hypertens* 1992; 6 Suppl 2:S3-8.
115. el-Mowafy AM, Abou-Mohamed GA. Endothelins-induce cyclicAMP formation in the guinea-pig trachea through an ETA receptor- and cyclooxygenase-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 1996; 118:531-6.
116. Abdel-Latif AA, Yousufzai SY, el-Mowafy AM, Ye Z. Prostaglandins mediate the stimulatory effects of endothelin-1 on cyclic adenosine monophosphate accumulation in ciliary smooth muscle isolated from bovine, cat, and other mammalian species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:328-38.
117. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993; 132:524-9.
118. Davis A, Hogarth K, Fernandes D, Solway J, Niu J, Kolenko V, Browning D, Miano JM, Orlov SN, Dulin NO. Functional significance of protein kinase A activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA. *Cell Signal* 2003; 15:597-604.
119. Domae M, Yamada K, Inoue T, Satoh M, Furukawa T. Endothelins stimulate cyclic AMP accumulation in the isolated rat anterior pituitary gland: possible involvement of ETA receptor activation and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:55-60.
120. Suzuki S, Suzuki A, Kajikuri J, Itoh T. Endothelin-1-induced prostaglandin E2 production: modulation of contractile response to endothelin-1 in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 1992; 217:97-100.
121. Deacon K, Knox AJ. Endothelin-1 (ET-1) increases the expression of remodeling genes in vascular smooth muscle through linked calcium and cAMP pathways: role of a phospholipase A(2)(cPLA(2))/cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostacyclin receptor-dependent autocrine loop. *J Biol Chem* 2010; 285:25913-27.
122. Horinouchi T, Terada K, Higashi T, Miwa S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *J Pharmacol Sci* 2013; 123:85-101.

123. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* 2003; 278:49929-35.
124. Herrera M, Hong NJ, Ortiz PA, Garvin JL. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J Biol Chem* 2009; 284:1454-60.
125. Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 199:237-47.
126. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9:726-35.
127. Bar-Sagi D. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1441-3.
128. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1263-84.
129. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66:105-43.
130. Eishingdrelo H, Kongsamut S. Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genomics Transl Med* 2013; 7:9-15.
131. Yogi A, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Schiffrin EL, Touyz RM. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1960-7.
132. Chen QW, Edvinsson L, Xu CB. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol* 2009; 10:52.
133. Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C251-60.
134. Robin P, Chouayekh S, Bole-Feysot C, Leiber D, Tanfin Z. Contribution of phospholipase D in endothelin-1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and proliferation in rat uterine leiomyoma cells. *Biol Reprod* 2005; 72:69-77.
135. Oyeniran C, Tanfin Z. MAPK14 cooperates with MAPK3/1 to regulate endothelin-1-mediated prostaglandin synthase 2 induction and survival in leiomyoma but not in normal myometrial cells. *Biol Reprod* 2011; 84:495-504.
136. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; 379:557-60.
137. Kamato D, Burch ML, Osman N, Zheng W, Little PJ. Therapeutic implications of endothelin and thrombin G-protein-coupled receptor transactivation of tyrosine and serine/threonine kinase cell surface receptors. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65:465-73.
138. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60:5310-7.
139. Spinella F, Caprara V, Di Castro V, Rosano L, Cianfrocca R, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91:395-405.
140. Grantcharova E, Reusch HP, Grossmann S, Eichhorst J, Krell HW, Beyersmann M, Rosenthal W, Oksche A. N-terminal proteolysis of the endothelin B receptor abolishes its ability to induce EGF receptor transactivation and contractile protein expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1288-96.

141. Hinsley EE, Hunt S, Hunter KD, Whawell SA, Lambert DW. Endothelin-1 stimulates motility of head and neck squamous carcinoma cells by promoting stromal-epithelial interactions. *Int J Cancer* 2012; 130:40-7.
142. Roux BT, Cottrell GS. G protein-coupled receptors: what a difference a 'partner' makes. *Int J Mol Sci* 2014; 15:1112-42.
143. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S. Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391:1616-22.
144. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 2005; 308:512-7.
145. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000; 148:1267-81.
146. McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 2000; 290:1574-7.
147. Maguire JJ, Kuc RE, Pell VR, Green A, Brown M, Kumar S, Wehrman T, Quinn E, Davenport AP. Comparison of human ETA and ETB receptor signalling via G-protein and beta-arrestin pathways. *Life Sci* 2012; 91:544-9.
148. Morris GE, Nelson CP, Brighton PJ, Standen NB, Challiss RA, Willets JM. Arrestins 2 and 3 differentially regulate ETA and P2Y2 receptor-mediated cell signaling and migration in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302:C723-34.
149. Rosano L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Spadaro F, Salvati E, Biroccio AM, Natali PG, Bagnato A. beta-arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced beta-catenin signaling. *Oncogene* 2013; 32:5066-77.
150. Cianfrocca R, Tocci P, Semprucci E, Spinella F, Di Castro V, Bagnato A, Rosano L. beta-Arrestin 1 is required for endothelin-1-induced NF-kappaB activation in ovarian cancer cells. *Life Sci* 2014; 118:179-84.
151. Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:699-727.
152. Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 2001; 11:406-12.
153. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem* 1993; 268:337-41.
154. Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem* 1997; 272:17734-43.
155. Gartner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H. Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2013; 288:32138-48.
156. Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 2007; 69:451-82.
157. Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275:17596-604.
158. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Papsdorf G, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W. Evidence for downregulation of the endothelin-B-receptor by the use of fluorescent endothelin-1 and a fusion protein consisting of the endothelin-B-receptor and the green fluorescent protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S44-7.
159. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1461-5.

160. Paasche JD, Attramadal T, Sandberg C, Johansen HK, Attramadal H. Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J Biol Chem* 2001; 276:34041-50.
161. Paasche JD, Attramadal T, Kristiansen K, Oksvold MP, Johansen HK, Huitfeldt HS, Dahl SG, Attramadal H. Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 2005; 67:1581-90.
162. Cramer H, Muller-Esterl W, Schroeder C. Subtype-specific desensitization of human endothelin ETA and ETB receptors reflects differential receptor phosphorylation. *Biochemistry* 1997; 36:13325-32.
163. Oh P, Horner T, Witkiewicz H, Schnitzer JE. Endothelin induces rapid, dynamin-mediated budding of endothelial caveolae rich in ET-B. *J Biol Chem* 2012; 287:17353-62.
164. Tonnessen T, Lunde PK, Giaid A, Sejersted OM, Christensen G. Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc Res* 1998; 39:633-43.
165. Lipa JE, Neligan PC, Perreault TM, Baribeau J, Levine RH, Knowlton RJ, Pang CY. Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors. *Am J Physiol* 1999; 276:H359-67.
166. Batra VK, McNeill JR, Xu Y, Wilson TW, Gopalakrishnan V. ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993; 264:C479-84.
167. Wright CE, Fozard JR. Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1988; 155:201-3.
168. Berti F, Rossoni G, Della Bella D, Villa LM, Buschi A, Trento F, Berti M, Tondo C. Nitric oxide and prostacyclin influence coronary vasomotor tone in perfused rabbit heart and modulate endothelin-1 activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:321-6.
169. Bird JE, Waldron TL. Incomplete inhibition of endothelin-1 pressor effects by an endothelin ETA receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1993; 240:295-8.
170. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999; 140:4659-68.
171. Pollock DM, Opgenorth TJ. Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am J Physiol* 1993; 264:R222-6.
172. Pollock DM, Pollock JS. Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281:F144-50.
173. Kisanuki YY, Emoto N, Ohuchi T, Widyantoro B, Yagi K, Nakayama K, Kedzierski RM, Hammer RE, Yanagisawa H, Williams SC, et al. Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice. *Hypertension* 2010; 56:121-8.
174. Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68:600-28.
175. Luscher TF, Seo BG, Buhler FR. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* 1993; 21:752-7.
176. Allcock GH, Venema RC, Pollock DM. ETA receptor blockade attenuates the hypertension but not renal dysfunction in DOCA-salt rats. *Am J Physiol* 1998; 275:R245-52.
177. Kassab S, Miller MT, Novak J, Reckelhoff J, Clower B, Granger JP. Endothelin-A receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1998; 31:397-402.

178. Masaoka H, Suzuki R, Hirata Y, Emori T, Marumo F, Hirakawa K. Raised plasma endothelin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 1989; 2:1402.
179. Fujitani Y, Ninomiya H, Okada T, Urade Y, Masaki T. Suppression of endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J Clin Invest* 1995; 95:2474-82.
180. MacNulty EE, Plevin R, Wakelam MJ. Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for Rat-1 fibroblasts. *Biochem J* 1990; 272:761-6.
181. Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48:675-88.
182. Hahn AW, Regenass S, Kern F, Buhler FR, Resink TJ. Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:189-97.
183. Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:1058-64.
184. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70:1191-7.
185. Martin-Nizard F, Houssaini HS, Lestavel-Delattre S, Duriez P, Fruchart JC. Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett* 1991; 293:127-30.
186. Mitani H, Takimoto M, Bandoh T, Kimura M. Increases of vascular endothelin-converting enzyme activity and endothelin-1 level on atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 2000; 387:313-9.
187. Dashwood MR, Barker SG, Muddle JR, Yacoub MH, Martin JF. [125I]-endothelin-1 binding to vasa vasorum and regions of neovascularization in human and porcine blood vessels: a possible role for endothelin in intimal hyperplasia and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S343-7.
188. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14367-72.
189. Li MW, Mian MO, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:2306-15.
190. Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-Lopez E, Plaza JJ, Egido J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005; 97:125-34.
191. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 1993; 72:526-38.
192. Leite MF, Page E, Ambler SK. Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol* 1994; 267:H2193-203.
193. Skvorak JP, Nazian SJ, Dietz JR. Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. *Am J Physiol* 1995; 269:R1093-8.
194. Cheng TH, Shih NL, Chen CH, Lin H, Liu JC, Chao HH, Liou JY, Chen YL, Tsai HW, Chen YS, et al. Role of mitogen-activated protein kinase pathway in reactive oxygen

- species-mediated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy. *J Biomed Sci* 2005; 12:123-33.
195. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46:325-415.
 196. Pieske B, Beyersmann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 1999; 99:1802-9.
 197. Clavell AL, Mattingly MT, Stevens TL, Nir A, Wright S, Aarhus LL, Heublein DM, Burnett JC, Jr. Angiotensin converting enzyme inhibition modulates endogenous endothelin in chronic canine thoracic inferior vena caval constriction. *J Clin Invest* 1996; 97:1286-92.
 198. Parker JD, Thiessen JJ. Increased endothelin-1 production in patients with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H1141-5.
 199. Tsutamoto T, Wada A, Maeda Y, Adachi T, Kinoshita M. Relation between endothelin-1 spillover in the lungs and pulmonary vascular resistance in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1427-33.
 200. Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:633-41.
 201. Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D, Komajda M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997; 18:254-8.
 202. Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:620-30.
 203. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:398-405.
 204. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114:464-9.
 205. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328:1732-9.
 206. Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary artery hypertension. *Life Sci* 2012; 91:517-21.
 207. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:943-55.
 208. Kohan DE. Endothelins: renal tubule synthesis and actions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23:337-44.
 209. Davenport AP, Nunez DJ, Brown MJ. Binding sites for ¹²⁵I-labelled endothelin-1 in the kidneys: differential distribution in rat, pig and man demonstrated by using quantitative autoradiography. *Clin Sci (Lond)* 1989; 77:129-31.
 210. Nambi P, Pullen M, Wu HL, Aiyar N, Ohlstein EH, Edwards RM. Identification of endothelin receptor subtypes in human renal cortex and medulla using subtype-selective ligands. *Endocrinology* 1992; 131:1081-6.
 211. Karet FE, Davenport AP. Comparative quantification of endothelin receptor mRNA in human kidney: new tools for direct investigation of human tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:S268-71.

212. Garvin J, Sanders K. Endothelin inhibits fluid and bicarbonate transport in part by reducing Na⁺/K⁺ ATPase activity in the rat proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:976-82.
213. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ, Webb DJ. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 2004; 109:1186-93.
214. Kohan DE. Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19:134-9.
215. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999; 353:133-8.
216. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368:703-10.
217. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, Yanagisawa M. Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice. *J Clin Invest* 1998; 102:22-33.
218. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998; 125:813-24.
219. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994; 79:1277-85.
220. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79:1267-76.
221. Sanai L, Haynes WG, MacKenzie A, Grant IS, Webb DJ. Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1996; 22:52-6.
222. Voerman HJ, Stehouwer CD, van Kamp GJ, Strack van Schijndel RJ, Groeneveld AB, Thijs LG. Plasma endothelin levels are increased during septic shock. *Crit Care Med* 1992; 20:1097-101.
223. Tschaikowsky K, Sagner S, Lehnert N, Kaul M, Ritter J. Endothelin in septic patients: effects on cardiovascular and renal function and its relationship to proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 2000; 28:1854-60.
224. Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E, Sokolovsky M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* 1992; 23:1014-6.
225. Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13:276-84.
226. Palmer JC, Baig S, Kehoe PG, Love S. Endothelin-converting enzyme-2 is increased in Alzheimer's disease and up-regulated by Abeta. *Am J Pathol* 2009; 175:262-70.
227. Palmer JC, Barker R, Kehoe PG, Love S. Endothelin-1 is elevated in Alzheimer's disease and upregulated by amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 2012; 29:853-61.
228. Palmer JC, Tayler HM, Love S. Endothelin-converting enzyme-1 activity, endothelin-1 production, and free radical-dependent vasoconstriction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013; 36:577-87.
229. George EM, Granger JP. Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. *Am J Hypertens* 2011; 24:964-9.
230. Tam Tam KB, George E, Cockrell K, Arany M, Speed J, Martin JN, Jr., Lamarca B, Granger JP. Endothelin type A receptor antagonist attenuates placental ischemia-induced hypertension and uterine vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204:330 e1-4.

231. Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med* 2007; 18:272-82.
232. Campia U, Tesauro M, Di Daniele N, Cardillo C. The vascular endothelin system in obesity and type 2 diabetes: Pathophysiology and therapeutic implications. *Life Sci* 2014; 118:149-55.
233. Atkinson RA, Pelton JT. Conformational study of cyclo[D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu], an endothelin-A receptor-selective antagonist. *FEBS Lett* 1992; 296:1-6.
234. Bazil MK, Lappe RW, Webb RL. Pharmacologic characterization of an endothelinA (ETA) receptor antagonist in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:940-8.
235. Breu V, Loffler BM, Clozel M. In vitro characterization of Ro 46-2005, a novel synthetic non-peptide endothelin antagonist of ETA and ETB receptors. *FEBS Lett* 1993; 334:210-4.
236. Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, Hirth G, Loffler BM, Muller M, Neidhart W, et al. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993; 365:759-61.
237. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loffler BM, Burri K, Cassal JM, Hirth G, Muller M, Neidhart W, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:228-35.
238. Fukuroda T, Nishikibe M, Ihara M, Yano M, Ishikawa K, Ikemoto F. Effects of a novel endothelin antagonist, BQ-153, on endothelin-induced vasoconstriction in porcine blood vessels. *Jpn J Pharmacol* 1992; 58 Suppl 2:278P.
239. Spinella MJ, Malik AB, Everitt J, Andersen TT. Design and synthesis of a specific endothelin 1 antagonist: effects on pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:7443-6.
240. Battistini B, Berthiaume N, Kelland NF, Webb DJ, Kohan DE. Profile of past and current clinical trials involving endothelin receptor antagonists: the novel "-sentan" class of drug. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:653-95.
241. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995; 346:732-6.
242. Hoeper MM. Liver toxicity: the Achilles' heel of endothelin receptor antagonist therapy? *Eur Respir J* 2009; 34:529-30.
243. Mann JF, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, Littke T, Viberti G. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:527-35.
244. Rubin LJ, Roux S. Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11:991-1002.
245. Galie N, Manes A, Palazzini M, Negro L, Marinelli A, Gambetti S, Mariucci E, Denti A, Branzi A, Picchio FM. Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. *Drugs* 2008; 68:1049-66.
246. D'Alto M, Romeo E, Argiento P, Correra A, Sarubbi B, Scognamiglio G, Grimaldi N, Pignatiello M, Calabro R, Russo MG. Ambrisentan for pulmonary arterial hypertension: long term effects on clinical status, exercise capacity and haemodynamics. *Int J Cardiol* 2012; 156:244-5.
247. Dhillon S. Bosentan: a review of its use in the management of digital ulcers associated with systemic sclerosis. *Drugs* 2009; 69:2005-24.
248. Galie N, Hoeper MM, Simon J, Gibbs R, Simonneau G. Liver toxicity of sitaxentan in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2011; 32:386-7.
249. Kiowski W, Sutsch G, Oechslin E, Bertel O. Hemodynamic effects of bosentan in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev* 2001; 6:325-34.
250. Kohan DE, Inscho EW, Wesson D, Pollock DM. Physiology of endothelin and the kidney. *Compr Physiol* 2011; 1:883-919.

251. Nakov R, Pfarr E, Eberle S. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:583-9.
252. Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50:3257-61.
253. Bagnato A, Rosano L. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1443-51.
254. Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Matsumoto H, Suzuki N, Kimura C, Ondo H, Fujino M. Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line. Molecular cloning of cDNA encoding the precursor of ET-2 and its characterization. *FEBS Lett* 1990; 274:136-40.
255. Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR. Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:1273-81.
256. Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C, Balkwill FR. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 2004; 64:2461-8.
257. Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, Sakamoto M. Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391:486-91.
258. Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* 2004; 64:1436-43.
259. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer Res* 2007; 67:1725-34.
260. Liu Y, Ye F, Yamada K, Tso JL, Zhang Y, Nguyen DH, Dong Q, Soto H, Choe J, Dembo A, et al. Autocrine endothelin-3/endothelin receptor B signaling maintains cellular and molecular properties of glioblastoma stem cells. *Mol Cancer Res* 2011; 9:1668-85.
261. Wang R, Lohr CV, Fischer K, Dashwood WM, Greenwood JA, Ho E, Williams DE, Ashktorab H, Dashwood MR, Dashwood RH. Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer. *Int J Cancer* 2013; 132:1004-12.
262. Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF, Brooks JD, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Nelson WG, Bova GS. Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57:35-7.
263. Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10:903-10.
264. Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J Urol* 2001; 165:1033-6.
265. Mai HQ, Zeng ZY, Zhang HZ, Hou JH, Mo HY, Guo X, Min HQ, Hong MH. [Correlation of endothelin A receptor expression to prognosis of nasopharyngeal carcinoma]. *Ai Zheng* 2005; 24:611-5.
266. Mai HQ, Zeng ZY, Feng KT, Ye YL, Zhang CQ, Liang WJ, Guo X, Mo HY, Hong MH. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97:1388-95.
267. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996; 56:663-8.
268. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res* 1999; 59:720-7.

269. Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res* 2002; 62:6381-4.
270. Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 2000; 47:685-8.
271. Kikuchi K, Nakagawa H, Kadono T, Etoh T, Byers HR, Mihm MC, Tamaki K. Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219:734-9.
272. Lin N, Huang C, Tian J, Tao J, Zhang J, Yang L, Li Y, Liu Y, Chen S, Shen G, et al. The expression of endothelin receptor B in melanoma cells A375 and Sk-mel-1 and the proliferative effects of endothelin 3 on A375 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27:611-3.
273. Paolillo M, Russo MA, Curti D, Lanni C, Schinelli S. Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells. *Pharmacol Res* 2010; 61:306-15.
274. Bagnato A, Rosano L, Di Castro V, Albini A, Salani D, Varmi M, Nicotra MR, Natali PG. Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol* 2001; 158:841-7.
275. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, Catt KJ. Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1059-66.
276. Moraitis S, Miller WR, Smyth JF, Langdon SP. Paracrine regulation of ovarian cancer by endothelin. *Eur J Cancer* 1999; 35:1381-7.
277. Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 57:1306-11.
278. Bagnato A, Spinella F, Rosano L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86:473-84.
279. Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:1492-7.
280. Bagnato A, Spinella F, Rosano L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12:761-72.
281. Bagnato A, Catt KJ. Endothelins as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:378-83.
282. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:110-6.
283. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosano L, Trisciuglio D, Spinella F, Bagnato A. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol* 2002; 61:524-32.
284. Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR. Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* 2005; 7:631-7.
285. Banerjee S, Hussain M, Wang Z, Saliganan A, Che M, Bonfil D, Cher M, Sarkar FH. In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:3818-26.
286. Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S354-6.
287. Akhavan A, McHugh KH, Guruli G, Bies RR, Zamboni WC, Strychor SA, Nelson JB, Pflug BR. Endothelin receptor A blockade enhances taxane effects in prostate cancer. *Neoplasia* 2006; 8:725-32.

288. Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:2003-11.
289. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265-73.
290. Ha NH, Nair VS, Reddy DN, Mudvari P, Ohshiro K, Ghanta KS, Pakala SB, Li DQ, Costa L, Lipton A, et al. Lactoferrin-endothelin-1 axis contributes to the development and invasiveness of triple-negative breast cancer phenotypes. *Cancer Res* 2011; 71:7259-69.
291. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Dedhar S, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:833-42.
292. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278:41294-301.
293. Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, Bhalla A, Dashwood MR, Yang S, Taylor I, Winslet MC, Abraham DJ, Loizidou M. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts. *Int J Cancer* 2012; 130:1264-72.
294. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:11649-57.
295. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133:704-15.
296. Puglisi MA, Barba M, Corbi M, Errico MF, Giorda E, Saulnier N, Boninsegna A, Piscaglia AC, Carsetti R, Cittadini A, et al. Identification of Endothelin-1 and NR4A2 as CD133-regulated genes in colon cancer cells. *J Pathol* 2011; 225:305-14.
297. Rosano L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Lucidi A, Ferrandina G, Natali PG, Bagnato A. Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17:2350-60.
298. Kim SJ, Kim JS, Kim SW, Brantley E, Yun SJ, He J, Maya M, Zhang F, Wu Q, Lehenbre F, et al. Macitentan (ACT-064992), a tissue-targeting endothelin receptor antagonist, enhances therapeutic efficacy of paclitaxel by modulating survival pathways in orthotopic models of metastatic human ovarian cancer. *Neoplasia* 2011; 13:167-79.
299. Cruz-Munoz W, Jaramillo ML, Man S, Xu P, Banville M, Collins C, Nantel A, Francia G, Morgan SS, Cranmer LD, et al. Roles for endothelin receptor B and BCL2A1 in spontaneous CNS metastasis of melanoma. *Cancer Res* 2012; 72:4909-19.
300. Titus B, Frierson HF, Jr., Conaway M, Ching K, Guise T, Chirgwin J, Hampton G, Theodorescu D. Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res* 2005; 65:7320-7.
301. Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M, Theodorescu D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* 2011; 121:132-47.
302. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157:1537-47.
303. Spinella F, Garrafa E, Di Castro V, Rosano L, Nicotra MR, Caruso A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade. *Cancer Res* 2009; 69:2669-76.

304. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157:1703-11.
305. Wulfig P, Diallo R, Kersting C, Wulfig C, Poremba C, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4125-31.
306. Wulfig P, Kersting C, Buerger H, Mattsson B, Mesters R, Gustmann C, Hinrichs B, Tio J, Bocker W, Kiesel L. Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br J Cancer* 2005; 92:1720-8.
307. Clasper S, Royston D, Baban D, Cao Y, Ewers S, Butz S, Vestweber D, Jackson DG. A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis. *Cancer Res* 2008; 68:7293-303.
308. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277:27850-5.
309. Spinella F, Rosano L, Del Duca M, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1alpha in melanoma cells. *PLoS One* 2010; 5:e11241.
310. Grimshaw MJ. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:233-44.
311. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4670-9.
312. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J Biol Chem* 2004; 279:46700-5.
313. Huang WH, Chang MC, Tsai KS, Hung MC, Chen HL, Hung SC. Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene* 2013; 32:4343-54.
314. Kuo HM, Lin CY, Lam HC, Lin PR, Chan HH, Tseng JC, Sun CK, Hsu TF, Wu CC, Yang CY, et al. PTEN overexpression attenuates angiogenic processes of endothelial cells by blockade of endothelin-1/endothelin B receptor signaling. *Atherosclerosis* 2012; 221:341-9.
315. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; 406:536-40.
316. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124:263-6.
317. Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol* 2002; 32:2393-400.
318. Said N, Theodorescu D. Permissive role of endothelin receptors in tumor metastasis. *Life Sci* 2012; 91:522-7.
319. Chen CC, Chen LL, Hsu YT, Liu KJ, Fan CS, Huang TS. The endothelin-integrin axis is involved in macrophage-induced breast cancer cell chemotactic interactions with endothelial cells. *J Biol Chem* 2014; 289:10029-44.
320. Ling L, Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br J Pharmacol* 2013; 168:283-95.
321. Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA, Coukos G. Endothelin B receptor mediates the

- endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* 2008; 14:28-36.
322. Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon DB, Chung LW, Inoue N. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* 1999; 53:1063-9.
323. Mohammad KS, Guise TA. Mechanisms of osteoblastic metastases: role of endothelin-1. *Clin Orthop Relat Res* 2003:S67-74.
324. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, Vessella R, Corey E, Padalecki S, Suva L, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6213s-6s.
325. Coyle N, Adelhardt J, Foley KM, Portenoy RK. Character of terminal illness in the advanced cancer patient: pain and other symptoms during the last four weeks of life. *J Pain Symptom Manage* 1990; 5:83-93.
326. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997; 80:1588-94.
327. Goblirsch MJ, Zwolak PP, Clohisy DR. Biology of bone cancer pain. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6231s-5s.
328. Davar G, Hans G, Fareed MU, Sinnott C, Strichartz G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. *Neuroreport* 1998; 9:2279-83.
329. Davar G. Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *Pain Med* 2001; 2:24-7.
330. Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, Beitz AJ, Wilcox GL. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J Neurosci* 2001; 21:9355-66.
331. Schmidt BL, Pickering V, Liu S, Quang P, Dolan J, Connelly ST, Jordan RC. Peripheral endothelin A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain. *Eur J Pain* 2007; 11:406-14.
332. Yuyama H, Koakutsu A, Fujiyasu N, Tanahashi M, Fujimori A, Sato S, Shibasaki K, Tanaka S, Sudoh K, Sasamata M, et al. Effects of selective endothelin ET(A) receptor antagonists on endothelin-1-induced potentiation of cancer pain. *Eur J Pharmacol* 2004; 492:177-82.
333. Cain DM, Wacnik PW, Eikmeier L, Beitz A, Wilcox GL, Simone DA. Functional interactions between tumor and peripheral nerve in a model of cancer pain in the mouse. *Pain Med* 2001; 2:15-23.
334. Peters CM, Lindsay TH, Pomonis JD, Luger NM, Ghilardi JR, Sevcik MA, Mantyh PW. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. *Neuroscience* 2004; 126:1043-52.
335. Quang PN, Schmidt BL. Peripheral endothelin B receptor agonist-induced antinociception involves endogenous opioids in mice. *Pain* 2010; 149:254-62.
336. Khodorova A, Fareed MU, Gokin A, Strichartz GR, Davar G. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. *J Neurosci* 2002; 22:7788-96.
337. Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy JE, Rice FL, Mazurkiewicz JE, Long-Woodward D, Stoffel M, Strichartz GR, Yukhananov R, et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med* 2003; 9:1055-61.
338. Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 2011; 163:220-33.

339. Gulati A, Rai A. Endothelin-1-induced vasodilatation in rat breast tumor is mediated through endothelin-B receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S483-6.
340. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Therapeutic targeting of the endothelin-A receptor in human ovarian carcinoma: efficacy of cytotoxic agents is markedly enhanced by co-administration with atrasentan. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S132-5.
341. Rosano L, Spinella F, Salani D, Di Castro V, Venuti A, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:2447-53.
342. Smollich M, Gotte M, Kersting C, Fischgrabe J, Kiesel L, Wulfing P. Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108:175-82.
343. Smollich M, Gotte M, Fischgrabe J, Macedo LF, Brodie A, Chen S, Radke I, Kiesel L, Wulfing P. ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123:345-57.
344. Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Tortora G, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 2007; 67:6351-9.
345. Berger Y, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L. Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:1111-9.
346. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 2003; 97:779-84.
347. Rosano L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Combination therapy of zibotentan with cisplatin and paclitaxel is an effective regimen for epithelial ovarian cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88:676-81.
348. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol* 2003; 163:753-62.
349. Fukui R, Nishimori H, Hata F, Yasoshima T, Ohno K, Yanai Y, Kamiguchi K, Denno R, Sato N, Hirata K. Inhibitory effect of endothelin A receptor blockade on tumor growth and liver metastasis of a human gastric cancer cell line. *Gastric Cancer* 2007; 10:123-8.
350. Nelson JB, Fizazi K, Miller K, Higano C, Moul JW, Akaza H, Morris T, McIntosh S, Pemberton K, Gleave M. Phase 3, randomized, placebo-controlled study of zibotentan (ZD4054) in patients with castration-resistant prostate cancer metastatic to bone. *Cancer* 2012; 118:5709-18.
351. Fizazi K, Higano CS, Nelson JB, Gleave M, Miller K, Morris T, Nathan FE, McIntosh S, Pemberton K, Moul JW. Phase III, randomized, placebo-controlled study of docetaxel in combination with zibotentan in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31:1740-7.
352. Miller K, Moul JW, Gleave M, Fizazi K, Nelson JB, Morris T, Nathan FE, McIntosh S, Pemberton K, Higano CS. Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16:187-92.
353. Yu EY, Miller K, Nelson J, Gleave M, Fizazi K, Moul JW, Nathan FE, Higano CS. Detection of previously unidentified metastatic disease as a leading cause of screening failure in a phase III trial of zibotentan versus placebo in patients with nonmetastatic, castration resistant prostate cancer. *J Urol* 2012; 188:103-9.
354. Carducci MA, Saad F, Abrahamsson PA, Dearnaley DP, Schulman CC, North SA, Sleep DJ, Isaacson JD, Nelson JB. A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy

- and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 2007; 110:1959-66.
355. Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J, Carducci M. Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 2008; 113:2478-87.
356. Quinn DI, Tangen CM, Hussain M, Lara PN, Jr., Goldkorn A, Moinpour CM, Garzotto MG, Mack PC, Carducci MA, Monk JP, et al. Docetaxel and atrasentan versus docetaxel and placebo for men with advanced castration-resistant prostate cancer (SWOG S0421): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14:893-900.
357. Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, Millward M, Trotter JM, Wyld DK, Kusic R, Shreeniwas R, Morganti A, Ballmer A, et al. A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 2007; 25:247-52.
358. Kefford RF, Clingan PR, Brady B, Ballmer A, Morganti A, Hersey P. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer* 2010; 9:69.
359. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, et al. Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2003; 21:679-89.
360. Rebbeck TR, Couch FJ, Kant J, Calzone K, DeShano M, Peng Y, Chen K, Garber JE, Weber BL. Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer: role of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1996; 59:547-53.
361. Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Ma YX, Meng Q, Erdos MR, Brody LC, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 as a potential human prostate tumor suppressor: modulation of proliferation, damage responses and expression of cell regulatory proteins. *Oncogene* 1998; 16:3069-82.
362. Domchek SM, Rebbeck TR. Preventive surgery is associated with reduced cancer risk and mortality in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. *LDI Issue Brief* 2010; 16:1-4.
363. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 156:885-902.
364. Hahn SA, Schmiegel WH. [Mutations of the hMSH2 and hMLH1 genes are responsible for 90% of hereditary colorectal carcinomas]. *Z Gastroenterol* 1995; 33:135-7.
365. Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract* 2014; 2014:357027.
366. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
367. Drake CG. Combination immunotherapy approaches. *Ann Oncol* 2012; 23 Suppl 8:viii41-6.
368. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999; 17:2105-16.
369. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13:688-96.

370. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; 14:7-17.
371. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:289-96.
372. Lans TE, Grunhagen DJ, de Wilt JH, van Geel AN, Eggermont AM. Isolated limb perfusions with tumor necrosis factor and melphalan for locally recurrent soft tissue sarcoma in previously irradiated limbs. *Ann Surg Oncol* 2005; 12:406-11.
373. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:83-117.
374. Zigler M, Shir A, Levitzki A. Targeted cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13:504-10.
375. Rosenberg SA, Kochenderfer JN. Personalized cell transfer immunotherapy for B-cell malignancies and solid cancers. *Mol Ther* 2011; 19:1928-30.
376. Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM, White D, Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother* 2010; 33:840-7.
377. Phan GQ, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 2013; 20:289-97.
378. Iinuma T, Homma S, Noda T, Kufe D, Ohno T, Toda G. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine. *J Clin Invest* 2004; 113:1307-17.
379. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:138-47.
380. Berinstein NL. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine* 2007; 25 Suppl 2:B72-88.
381. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:309-35.
382. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1755-66.
383. Westdorp H, Skold AE, Snijer BA, Franik S, Mulder SF, Major PP, Foley R, Gerritsen WR, de Vries IJ. Immunotherapy for prostate cancer: lessons from responses to tumor-associated antigens. *Front Immunol* 2014; 5:191.
384. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:345-52.
385. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:317-27.
386. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:495-527.
387. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S41-52.
388. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:21-50.
389. Torres M, Casadevall A. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. *Trends Immunol* 2008; 29:91-7.

390. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993; 363:446-8.
391. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem* 2009; 284:3273-84.
392. von Behring E, Kitasato S. [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol Immunol* 1991; 28:1317, 9-20.
393. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-8.
394. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7.
395. Jerne NK, Nordin AA. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science* 1963; 140:405.
396. Emmons C, Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med* 1987; 77:78-82.
397. Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun* 2012; 12:14.
398. Zhang Q, Chen G, Liu X, Qian Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Res* 2007; 17:89-99.
399. Pendley C, Schantz A, Wagner C. Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5:172-9.
400. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332:323-7.
401. Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10029-33.
402. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321:522-5.
403. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994; 368:856-9.
404. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994; 7:13-21.
405. Bruggemann M, Taussig MJ. Production of human antibody repertoires in transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8:455-8.
406. Hust M, Dubel S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol* 2004; 22:8-14.
407. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-17.
408. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357:39-51.
409. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47:115-23.
410. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:711-23.
411. Glassman PM, Balthasar JP. Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Biol Med* 2014; 11:20-33.
412. Yamada T. Therapeutic monoclonal antibodies. *Keio J Med* 2011; 60:37-46.

413. Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 1990; 50:814s-9s.
414. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN. A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J Nucl Med* 1990; 31:1191-8.
415. Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, Weinstein JN. Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res* 1992; 52:5144-53.
416. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:719-26.
417. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-92.
418. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 2009; 69:9330-6.
419. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:109-19.
420. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E, Nesland JM. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 2002; 196:17-25.
421. Gaborit N, Larbouret C, Vallaghe J, Peyrusson F, Bascoul-Mollevis C, Crapez E, Azria D, Charde T, Poul MA, Mathis G, et al. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 2011; 286:11337-45.
422. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol Rev* 2010; 236:265-75.
423. Griggs J, Zinkewich-Peotti K. The state of the art: immune-mediated mechanisms of monoclonal antibodies in cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; 101:1807-12.
424. Braster R, O'Toole T, van Egmond M. Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer. *Methods* 2014; 65:28-37.
425. van der Bij GJ, Bogels M, Otten MA, Oosterling SJ, Kuppen PJ, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. Experimentally induced liver metastases from colorectal cancer can be prevented by mononuclear phagocyte-mediated monoclonal antibody therapy. *J Hepatol* 2010; 53:677-85.
426. Watanabe M, Wallace PK, Keler T, Deo YM, Akewanlop C, Hayes DF. Antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of breast cancer cells mediated by bispecific antibody, MDX-210. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:199-207.
427. Steplewski Z, Lubeck MD, Koprowski H. Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells. *Science* 1983; 221:865-7.
428. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6:443-6.
429. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002; 99:754-8.

430. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1789-96.
431. Natsume A, Wakitani M, Yamane-Ohnuki N, Shoji-Hosaka E, Niwa R, Uchida K, Satoh M, Shitara K. Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded antibody comprising a single-chain antibody linked the antibody constant region. *J Immunol Methods* 2005; 306:93-103.
432. Capone PM, Papsidero LD, Croghan GA, Chu TM. Experimental tumoricidal effects of monoclonal antibody against solid breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:7328-32.
433. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol* 2003; 171:1581-7.
434. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 2004; 103:2738-43.
435. Racila E, Link BK, Weng WK, Witzig TE, Ansell S, Maurer MJ, Huang J, Dahle C, Halwani A, Levy R, et al. A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6697-703.
436. Yan J, Allendorf DJ, Li B, Yan R, Hansen R, Donev R. The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* 2008; 632:159-74.
437. Wang SY, Veeramani S, Racila E, Cagley J, Fritzinger DC, Vogel CW, St John W, Weiner GJ. Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood* 2009; 114:5322-30.
438. Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, Richards JO, Vostiar I, Joyce PF, Repp R, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 2008; 68:8049-57.
439. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:2517-27.
440. Kellner C, Derer S, Valerius T, Peipp M. Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods* 2014; 65:105-13.
441. Natsume A, In M, Takamura H, Nakagawa T, Shimizu Y, Kitajima K, Wakitani M, Ohta S, Satoh M, Shitara K, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res* 2008; 68:3863-72.
442. Jung ST, Kelton W, Kang TH, Ng DT, Andersen JT, Sandlie I, Sarkar CA, Georgiou G. Effective phagocytosis of low Her2 tumor cell lines with engineered, aglycosylated IgG displaying high FcγRIIIa affinity and selectivity. *ACS Chem Biol* 2013; 8:368-75.
443. Fan Z, Masui H, Altas I, Mendelsohn J. Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1993; 53:4322-8.
444. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1126-36.
445. Presta L. Antibody engineering for therapeutics. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13:519-25.
446. Brischwein K, Schlereth B, Guller B, Steiger C, Wolf A, Lutterbuese R, Offner S, Locher M, Urbig T, Raum T, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody

- construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 2006; 43:1129-43.
447. Schoffelen R, Boerman OC, Goldenberg DM, Sharkey RM, van Herpen CM, Franssen GM, McBride WJ, Chang CH, Rossi EA, van der Graaf WT, et al. Development of an imaging-guided CEA-pretargeted radionuclide treatment of advanced colorectal cancer: first clinical results. *Br J Cancer* 2013; 109:934-42.
448. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271:1734-6.
449. Momtaz P, Postow MA. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. *Pharmgenomics Pers Med* 2014; 7:357-65.
450. Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hunig T. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 1997; 27:239-47.
451. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85:715-36.
452. Pallardy M. [Toxic effects and use of therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)* 2009; 25:1130-4.
453. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, Kammula US, Topalian SL, Sherry RM, Kleiner D, et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006; 24:2283-9.
454. Hurwitz HI, Bekaii-Saab TS, Bendell JC, Cohn AL, Kozloff M, Roach N, Mun Y, Fish S, Flick ED, Grothey A. Safety and effectiveness of bevacizumab treatment for metastatic colorectal cancer: final results from the Avastin((R)) Registry - Investigation of Effectiveness and Safety (ARIES) observational cohort study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2014; 26:323-32.
455. Thomas M. Cetuximab: adverse event profile and recommendations for toxicity management. *Clin J Oncol Nurs* 2005; 9:332-8.
456. Balduzzi S, Mantarro S, Guarneri V, Tagliabue L, Pistotti V, Moja L, D'Amico R. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 6:CD006242.
457. Winkler U, Jensen M, Mancke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94:2217-24.
458. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355:1018-28.
459. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, Mellstedt H. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 1997; 15:1567-74.
460. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:325-38.
461. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63:1256-72.
462. Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs* 2010; 2:594-606.

463. Doppalapudi VR, Tryder N, Li L, Aja T, Griffith D, Liao FF, Roxas G, Ramprasad MP, Bradshaw C, Barbas CF, 3rd. Chemically programmed antibodies: endothelin receptor targeting CovX-Bodies. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17:501-6.
464. Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, Luis E, Tien J, Firestein R, Polakis P. An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17:965-75.
465. Asundi J, Lacap JA, Clark S, Nannini M, Roth L, Polakis P. MAPK pathway inhibition enhances the efficacy of an anti-endothelin B receptor drug conjugate by inducing target expression in melanoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13:1599-610.
466. Allard B, Wijkhuisen A, Borruhl A, Deshayes F, Priam F, Lamourette P, Ducancel F, Boquet D, Couraud JY. Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor. *MAbs* 2013; 5:56-69.
467. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol* 2007; 8:773-83.
468. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:502-16.
469. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* 1995; 1:944-9.
470. Le Brun G, Moldovan F, Aubin P, Ropiquet F, Cussenot O, Fiet J. Identification of endothelin receptors in normal and hyperplastic human prostate tissues. *Prostate* 1996; 28:379-84.
471. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, et al. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 1998; 4:50-7.
472. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; 28:251-65.
473. Papatsoris AG, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. The power and promise of "rewiring" the mitogen-activated protein kinase network in prostate cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:811-9.
474. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990; 343:651-3.
475. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991; 10:885-92.
476. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692:77-102.
477. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 2010; 123:1007-13.
478. Growcott JW. Preclinical anticancer activity of the specific endothelin A receptor antagonist ZD4054. *Anticancer Drugs* 2009; 20:83-8.
479. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1680-8.
480. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356:152-4.

481. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259:1745-9.
482. Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 1993; 4:151-9.
483. Xue H, Liang F, Liu N, Song X, Yuan F, Luo Y, Zhao X, Long J, Sun Y, Xi Y. Potent antirheumatic activity of a new DNA vaccine targeted to B7-2/CD28 costimulatory signaling pathway in autoimmune arthritis. *Hum Gene Ther* 2011; 22:65-76.
484. Chua KY, Kuo IC, Huang CH. DNA vaccines for the prevention and treatment of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9:50-4.
485. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008; 9:776-88.
486. Rochard A, Scherman D, Bigey P. Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum Gene Ther* 2011; 22:789-98.
487. van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk SL, Babiuk LA. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol Rev* 2004; 199:113-25.
488. Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Creminon C, Boquet D, Couraud JY. Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hPrP) in wild-type animals: a comparison between DNA and protein immunizations. *J Immunol Methods* 2009; 341:41-9.
489. Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 1998; 16:867-70.
490. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; 1:841-5.
491. Mir LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35:107-18.
492. Bettan M, Emmanuel F, Darteil R, Caillaud JM, Soubrier F, Delaere P, Branelec D, Mahfoudi A, Duverger N, Scherman D. High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther* 2000; 2:204-10.
493. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol* 2000; 164:4635-40.
494. Li Z, Song D, Zhang H, He W, Fan X, Zhang Y, Huang J, Wang X, Liu Q, Xiong S. Improved humoral immunity against tuberculosis ESAT-6 antigen by chimeric DNA prime and protein boost strategy. *DNA Cell Biol* 2006; 25:25-30.
495. Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuisen A, Couraud JY. Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biol* 2011; 30:727-37.
496. Lee AH, Suh YS, Sung JH, Yang SH, Sung YC. Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol Cells* 1997; 7:495-501.
497. Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunoassays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods* 1989; 123:193-210.
498. Everitt JI, Wolf DC, Howe SR, Goldsworthy TL, Walker C. Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Clinical and pathological features. *Am J Pathol* 1995; 146:1556-67.

499. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol* 2011; 5:124-36.
500. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150:251-63.
501. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, Bray F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer* 2013; 132:385-400.
502. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2014; 383:816-27.
503. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012; 26:1131-55.
504. Soufir N, Ollivaud L, Bertrand G, Lacapere JJ, Descamps V, Vitoux D, Lebbe C, Wolkenstein P, Dupin N, Saiag P, et al. A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation. *J Dermatol Sci* 2007; 46:61-4.
505. Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, Dessen P, d'Hayer B, Mohamdi H, Remenieras A, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 2011; 480:94-8.
506. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, Gartside M, Cust AE, Haq R, Harland M, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011; 480:99-103.
507. Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol* 2006; 19 Suppl 2:S4-20.
508. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bennicelli JL, Herlyn D, Elder DE, Bondi E, Guerry D, Nowell P, Clark WH, et al. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* 1985; 45:5670-6.
509. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445:851-7.
510. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15:1147-65.
511. Grichnik JM. Melanoma, nevogenesis, and stem cell biology. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2365-80.
512. Ghislin S, Deshayes F, Lauriol J, Middendorp S, Martins I, Al-Daccak R, Alcaide-Loridan C. Plasticity of melanoma cells induced by neural cell crest conditions and three-dimensional growth. *Melanoma Res* 2012; 22:184-94.
513. Ghislin S, Obino D, Middendorp S, Boggetto N, Alcaide-Loridan C, Deshayes F. LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer* 2012; 12:455.
514. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:746-59.
515. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 2011; 91:647-64.
516. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27:6199-206.
517. Saldana-Caboverde A, Kos L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:160-70.
518. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:1493-506.

519. Liu J, Fukunaga-Kalabis M, Li L, Herlyn M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014.
520. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 2013; 30:30-41.
521. Fitzpatrick TB, Breathnach AS. [the Epidermal Melanin Unit System]. *Dermatol Wochenschr* 1963; 147:481-9.
522. Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 1999; 402:496-501.
523. Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, Le Douarin NM. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:7882-7.
524. Hou L, Pavan WJ, Shin MK, Arnheiter H. Cell-autonomous and cell non-autonomous signaling through endothelin receptor B during melanocyte development. *Development* 2004; 131:3239-47.
525. Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:3892-7.
526. Lahav R, Dupin E, Lecoin L, Glavieux C, Champeval D, Ziller C, Le Douarin NM. Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14214-9.
527. Opdecamp K, Kos L, Arnheiter H, Pavan WJ. Endothelin signalling in the development of neural crest-derived melanocytes. *Biochem Cell Biol* 1998; 76:1093-9.
528. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E. Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol* 2006; 300:656-69.
529. Ono H, Kawa Y, Asano M, Ito M, Takano A, Kubota Y, Matsumoto J, Mizoguchi M. Development of melanocyte progenitors in murine Steel mutant neural crest explants cultured with stem cell factor, endothelin-3, or TPA. *Pigment Cell Res* 1998; 11:291-8.
530. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30:2522-9.
531. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6:313-9.
532. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18:3242-9.
533. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23:529-45, ix.
534. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, Town A, Harlow A, Cruz F, 3rd, Azar S, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6821-8.
535. Eberle J, Weitmann S, Thieck O, Pech H, Paul M, Orfanos CE. Downregulation of endothelin B receptor in human melanoma cell lines parallel to differentiation genes. *J Invest Dermatol* 1999; 112:925-32.
536. Yohn JJ, Smith C, Stevens T, Hoffman TA, Morelli JG, Hurt DL, Yanagisawa M, Kane MA, Zamora MR. Human melanoma cells express functional endothelin-1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201:449-57.
537. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; 24:227-35.

538. Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 2001; 438:485-91.
539. Soufir N, Meziani R, Lacapere JJ, Bertrand G, Fumeron F, Bourillon A, Gerard B, Descamps V, Crickx B, Ollivaud L, et al. Association between endothelin receptor B nonsynonymous variants and melanoma risk. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1297-301.
540. Tang L, Su M, Zhang Y, Ip W, Martinka M, Huang C, Zhou Y. Endothelin-3 is produced by metastatic melanoma cells and promotes melanoma cell survival. *J Cutan Med Surg* 2008; 12:64-70.
541. An XJ, Li YQ, Qu XY, Zhang J, Zhang LY, Wang M, Zhu L, Chen SY, Chen HX, Tu YT, et al. Silencing endothelin-3 expression attenuates the malignant behaviors of human melanoma cells by regulating SPARC levels. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33:581-6.
542. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 9):1535-42.
543. Lahav R, Suva ML, Rimoldi D, Patterson PH, Stamenkovic I. Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. *Cancer Res* 2004; 64:8945-53.
544. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, Moon J, Sondak VK, Atkins MB, Eisenhauer EA, et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:527-34.
545. Russo A, Ficili B, Candido S, Pezzino FM, Guarneri C, Biondi A, Travali S, McCubrey JA, Spandidos DA, Libra M. Emerging targeted therapies for melanoma treatment (review). *Int J Oncol* 2014; 45:516-24.
546. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:320-8.
547. Mansh M. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale J Biol Med* 2011; 84:381-9.
548. Robert C, Ghiringhelli F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 2009; 14:848-61.
549. Luke JJ, Hodi FS. Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. *Oncologist* 2013; 18:717-25.
550. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364:2507-16.
551. Kandalaft LE, Motz GT, Duraiswamy J, Coukos G. Tumor immune surveillance and ovarian cancer: lessons on immune mediated tumor rejection or tolerance. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30:141-51.
552. Schinelli S. Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem* 2006; 13:627-38.
553. de Tayrac M, Saikali S, Aubry M, Bellaud P, Boniface R, Quillien V, Mosser J. Prognostic significance of EDN/RB, HJURP, p60/CAF-1 and PDLI4, four new markers in high-grade gliomas. *PLoS One* 2013; 8:e73332.
554. Hsieh WT, Yeh WL, Cheng RY, Lin C, Tsai CF, Huang BR, Wu CY, Lin HY, Huang SS, Lu DY. Exogenous endothelin-1 induces cell migration and matrix metalloproteinase expression in U251 human glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2014; 118:257-69.
555. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyooka T, Masaki T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine

their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J Biol Chem* 1993; 268:8547-53.

556. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 1975; 35:218-24.

557. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC, Weilbaecher KN, Eltoum IA, Siegal GP, Fisher DE, Chhieng DC. Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:930-6.

558. O'Hayre M, Degese MS, Gutkind JS. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 27:126-35.

559. Fujimoto A, Kosaka N, Hasegawa H, Suzuki H, Sugano S, Chiba J. Enhancement of antibody responses to native G protein-coupled receptors using *E. coli* GroEL as a molecular adjuvant in DNA immunization. *J Immunol Methods* 2012; 375:243-51.

560. Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Priam F, Allard B, Boquet D, Couraud JY. Electrotransfer of cDNA coding for a heterologous prion protein generates autoantibodies against native murine prion protein in wild-type mice. *DNA Cell Biol* 2010; 29:121-31.

561. Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:630-44.

562. Herbert C, Schieborr U, Saxena K, Juraszek J, De Smet F, Alcouffe C, Bianciotto M, Saladino G, Sibrac D, Kudlinzki D, et al. Molecular mechanism of SSR128129E, an extracellularly acting, small-molecule, allosteric inhibitor of FGF receptor signaling. *Cancer Cell* 2013; 23:489-501.

563. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Heeson S, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:724-34.

564. Wu AM. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods* 2014; 65:139-47.

565. Bertheleme N, Chae PS, Singh S, Mossakowska D, Hann MM, Smith KJ, Hubbard JA, Dowell SJ, Byrne B. Unlocking the secrets of the gatekeeper: methods for stabilizing and crystallizing GPCRs. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828:2583-91.

566. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289:739-45.

567. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2007; 450:383-7.

568. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318:1258-65.

569. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 2011; 477:549-55.

570. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, DeVree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 2011; 469:175-80.

571. Hino T, Iwata S, Murata T. Generation of functional antibodies for mammalian membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23:563-8.

ANNEXES

Allard B, Wijkhuisen A, Borrull A, Deshayes F, Priam F, Lamourette P, Ducancel F, Boquet D, Couraud JY. Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor. *MAbs* 2013; 5:56-69.

REPORT

mAbs 5:1, 1–14; January/February 2013; © 2013 Landes Bioscience

Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor

Bertrand Allard,^{1,†} Anne Wijkhuisen,^{1,2,†} Aurélie Borrull,¹ Frédérique Deshayes,³ Fabienne Priam,^{1,2} Patricia Lamourette,⁴ Frédéric Ducancel,^{1,*} Didier Boquet¹ and Jean-Yves Couraud^{1,2}

¹CEA; iBiTecS; SPI; Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS); France; ²Univ Paris Diderot; Sorbonne Paris Cité; Yvette, France; ³Univ Paris Diderot; Sorbonne Paris Cité; UJM; Paris, France; ⁴CEA; iBiTecS; SPI; Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse (LERI); Yvette, France

[†]These authors have contributed equally to the work.

Keywords: endothelin B receptor, monoclonal antibody, antagonist, genetic immunization, GPCRs, melanoma

Abbreviations: ETBR, endothelin B receptor; ETAR, endothelin A receptor

Endothelin B receptor (ETBR) is a G protein-coupled receptor able to bind equally to the three identified human endothelin peptides. It is expressed primarily on vascular endothelial cells and involved in various physiological processes including vascular tone homeostasis, enteric nervous system development, melanogenesis and angiogenesis. Furthermore, overactivation or overexpression of ETBR have been associated with the development of various diseases such as cardiovascular disorders and cancers. Therefore, ETBR appears to be relevant target for the therapy or diagnosis of highly prevalent human diseases. In this study, we report the in vitro characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody (mAb) obtained by genetic immunization, which selectively recognizes the native form of human ETBR (hETBR). Rendomab-B1 is the first-reported mAb that behaves as a potent antagonist of hETBR. It recognizes an original extracellular conformational epitope on the receptor, distinct from the endothelin-1 (ET-1) binding site. Rendomab-B1 not only blocks ET-1-induced calcium signaling pathway and triggers rapid receptor internalization on recombinant hETBR-expressing cells, but also exerts pharmacological activities on human vascular endothelial cells, reducing both cell viability and ET-1-induced hETBR synthesis. In addition, binding experiments using rendomab-B1 on different melanoma cell lines reveal the structural and functional heterogeneity of hETBR expressed at the surface of these cancer cells, strongly suggesting the existence of tumor-specific receptors. Collectively, our results underscore the value of rendomab-B1 for research, therapeutic and diagnostic applications dealing with hETBR.

Introduction

The endothelin family is composed of three identified isopeptides termed ET-1, ET-2 and ET-3. Each peptide is characterized by a 21-amino-acid primary sequence, two intramolecular disulfide bridges and strong sequence similarities with cardiotoxic peptides (the sarafotoxins) found in the venom of the snake *Atractaspis engaddensis*.¹ In humans, endothelins are produced by various organs^{2–4} following a complex biosynthesis pathway requiring the cleavage of pro-peptides (the big-endothelins) by endothelin-converting enzymes to obtain mature and physiologically active endothelins. Among the three endothelins, ET-1 is the most abundant isoform and is mainly generated within the vascular wall. Once produced, the endothelins exert their biological action in a paracrine or autocrine fashion and intervene

in a wide range of physiological functions such as vascular tone homeostasis,^{5–7} neural crest development,⁸ ovarian cycle,⁹ cell proliferation, angiogenesis and inflammation.¹⁰ To mediate their numerous physiological effects, endothelins activate two distinct G protein-coupled receptors: ETA receptor (ETAR) and ETB receptor (ETBR). ETBR equally binds all three endothelin isoforms, whereas ETAR shows a higher affinity for ET-1 and ET-2 than for ET-3. Both receptors present a quasi-ubiquitous expression pattern, but ETAR predominates on vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes while ETBR is particularly abundant on vascular endothelial cells.

Endothelins and their receptors (i.e., the endothelin axis) have been implicated in a large variety of diseases.⁴ Vascular endothelial ETBR notably is involved in the two most prevalent diseases in humans, i.e., cardiovascular disorders and cancers.

*Correspondence to: Frédéric Ducancel; Email: Frederic.ducancel@cea.fr
Submitted: 09/07/12; Revised: 10/23/12; Accepted: 10/28/12
<http://dx.doi.org/10.4161/mabs.22696>

Overexpression or overstimulation of endothelial ETBR promotes atherosclerotic lesions, tissue fibrosis and atheroma plaque development.¹¹ In the field of oncology too, the pathological role of endothelial ETBR has been particularly documented in recent years since it has been reported that ETBR located in the tumor-surrounding vascular endothelium is implicated in: (1) cancer cell growth (by increasing neoangiogenesis¹²); (2) invasiveness and metastatic dissemination (by promoting macrophage homing to tumors, which release extracellular matrix-degrading metalloproteinases^{13,14}); and (3) tumor escape from immune surveillance (by largely reducing cytotoxic T cell homing to tumors).^{15,16} Besides this deleterious role played by endothelial ETBR in any kind of cancer, it has also long been reported that some tumor cells themselves can overexpress ETBR, which contributes to their development and aggressiveness.¹⁷ This has been demonstrated essentially for melanoma,^{18,19} but also for glioblastomas,²⁰ and bone and lung cancers.²¹

In this context, we decided to develop new tools not only to gather more information on human ETBR (hETBR) cytochemical distribution, structure and roles under both normal and pathological conditions, but also, ideally, to block this receptor, i.e., to exert antagonist activity when hETBR is associated with vascular disease and cancer, for example. Currently, the only way to investigate the structural-pharmacological properties of ETBR is to use small chemical agents, displaying either antagonist (bosentan, BQ-788) or agonist (IRL-1620, sarafotoxins) properties. These small molecules are very useful but they generally lack specificity (e.g., bosentan is a dual ETAR/ETBR antagonist), give relatively little information concerning receptor structure, are not adapted for imaging and often remain ineffective for some therapeutic applications. Consequently, we focused on the development of monoclonal antibodies (mAbs), which have emerged as very attractive alternatives to conventional chemicals to study the pharmacology of membrane proteins and to design original treatments. Monoclonal antibodies are often more specific than “small molecules,” allowing discrimination between highly similar target isoforms or subtle conformational variations.^{22,23} They can be used in a wide range of assays (e.g., flow cytometry, immuno-imaging, western blotting) and also for protein purification and crystallization. Finally, from a clinical point of view, mAbs present numerous advantages over other pharmaceuticals that position them among blockbuster drugs in various indications.²⁴⁻²⁶

To this end, we produced a panel of 27 murine mAbs targeting human ETBR using an original electroporation-aided DNA immunization strategy that favors the production of pharmacologically active antibodies directed against the native form of membrane-spanning proteins.²⁷⁻²⁹ Competition binding tests, performed early during the screening process, revealed that, among these specific anti-hETBR antibodies, only one displayed very strong antagonist properties and thus appeared particularly suited to our purpose. This antibody was named rendomab-B1 and was selected for further detailed *in vitro* characterization, which is described here. The properties of the other anti-hETBR mAbs will be reported later. Rendomab-B1 can be distinguished from all other formerly produced anti-ETBR antibodies by

its potent antagonist properties and its ability to induce rapid hETBR internalization, its capacity to trigger long-term hETBR mRNA downmodulation in endothelial cells, and finally by an original conformational epitope on hETBR. Moreover, unexpectedly, it displayed the noteworthy ability to discriminate between hETBR expressed on melanoma vs. non-cancerous cells, thus suggesting that melanoma-specific hETBR might exist. Together, these results suggest that rendomab-B1 is an outstanding biological tool, not only to block hETBR signaling pathways in the context of a therapeutic use, but also to investigate the molecular structure and role of hETBR under both normal and pathological conditions.

Results

Production and selection of rendomab-B1. As we demonstrated in a previous paper,²⁹ DNA immunization is a powerful approach to generate specific polyclonal antibodies against hETBR, and more generally against GPCRs. Therefore, the same method of immunization was used in the present study to generate anti-hETBR mAbs (Fig. 1A, see legend). The two mice with the highest ratio of specific antibodies, determined by flow cytometric analysis (Fig. 1B), were sacrificed and used for hybridoma production. Hybridoma supernatants were first screened using the living cell-based ELISA that we described previously.²⁹ Then, the specificity of positive hybridoma was further confirmed by flow cytometric tests (data not shown) performed on three cell types (CHO cells transfected or not with hETBR, or transfected with an irrelevant GPCR, the NK1 human receptor for the neuropeptide substance P). These differential screenings, followed by the limiting dilution step, led to the selection of 27 pure clones (out of 169 initially selected by the ELISA test). All antibodies were then isotyped (3 IgM, 8 IgG1, 9 IgG2a, 4 IgG2b and 3 IgG3), produced in large quantities and affinity-purified. Purity was checked by gel electrophoresis (not shown). Since we were particularly searching for an antibody displaying antagonist properties, for the different reasons explained above, competition binding experiments were performed at this stage, using flow cytometry. CHO-hETBR cells were incubated in the presence of a fixed ET-1 FAM concentration (10 nM), with or without a single concentration of each antibody (100 nM), including control isotypic antibodies. Under these conditions, only one antibody, which we called rendomab-B1, inhibited ET-1 binding by almost 90%, whereas the percent of binding inhibition measured for all other antibodies, if any, did not exceed 30% (not shown). As a consequence, we focused on rendomab-B1 (an IgG2b) for further *in vitro* characterization. The 26 other specific anti-hETBR mAbs, which displayed binding properties clearly different from those of rendomab-B1, could be also considered as valuable tools for studying hETBR and will be described elsewhere.

Rendomab-B1 binds to native hETBR on different cell lines with a high affinity, without cross-reaction with hETAR. To confirm the specificity observed during the screening procedure with hybridoma supernatants and preliminary competition experiments, we checked the ability of the purified rendomab-B1 to recognize native hETBR expressed at the surface

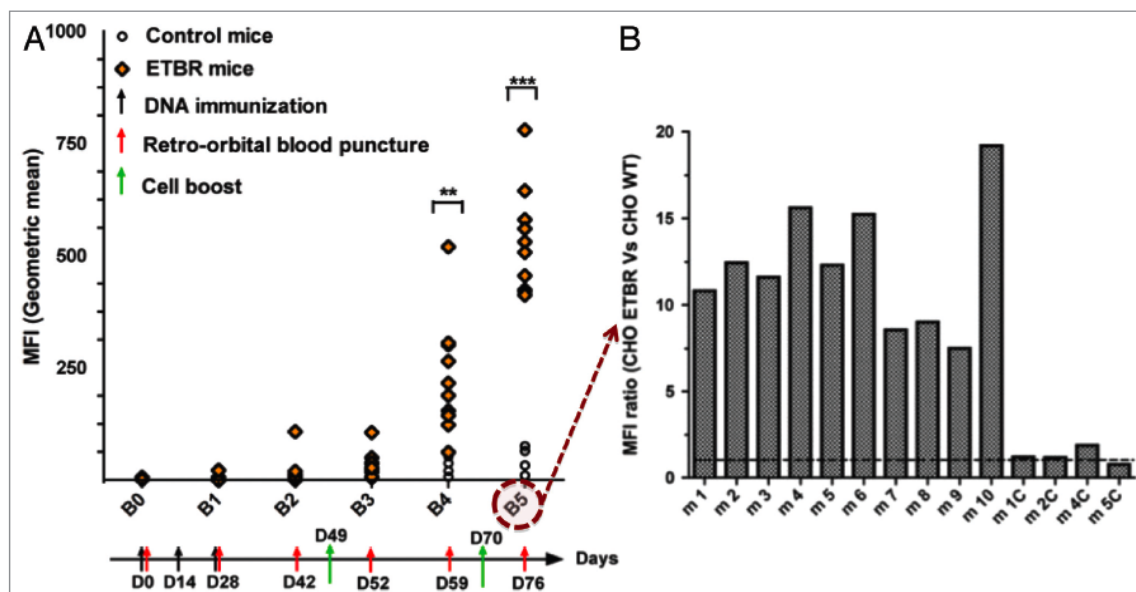


Figure 1. DNA immunization generates specific anti-hETBR polyclonal antibodies. (A) The anti-hETBR polyclonal immune response was monitored throughout the immunization procedure. Bleedings (Bx) were performed before and after the DNA immunizations and cell boosts, and then assayed by flow cytometry on hETBR transfected CHO cells. **, *** stand for $p < 0.01$ and 0.001 , respectively, for Student's *t* test (comparison between hETBR and control mice groups). (B) Sera corresponding to the fifth blood puncture (B5) were analyzed for their specificity toward hETBR, using flow cytometry on transfected and untransfected cells. Fluorescence ratio between hETBR-transfected and untransfected cells is reported for each serum and stands for the specificity of the serum. mx = hETBR immunized mouse $n^{\circ}x$; mxC = empty plasmid immunized mouse $n^{\circ}x$. Mice $n^{\circ}4$ and 10 were sacrificed and used for hybridoma production.

of different recombinant cell lines. Flow cytometric experiments demonstrated that rendomab-B1 specifically binds not only to the CHO-hETBR cell line, but also to hETBR-transfected HEK cells (Fig. 2A). Untransfected CHO cells remained unstained, whereas slight staining was still observed in untransfected HEK cells (Fig. 2A). The latter result is in accordance with the fact that wild-type HEK cells are known to express hETBR naturally, and thus indicates that rendomab-B1 is actually able to recognize the native receptor at the surface of a non-recombinant cell line. To confirm the specificity of rendomab-B1 toward hETBR, we performed RNAi experiments, which revealed a specific 90% decrease in cell surface rendomab-B1 binding in hETBR-silenced cells (pink histogram, lower panel, Fig. 2).

The K_D of rendomab-B1 for hETBR was determined through binding experiments using a large range of antibody concentrations. As depicted in Figure 2B and C, rendomab-B1 is able to bind to hETBR expressed on stably transfected CHO and HEK cells, with a remarkable affinity of 660 ± 150 and 580 ± 50 pM, respectively (mean \pm s.d). Moreover, despite a low but specific signal, a similar affinity constant can be obtained with wild-type HEK cells, showing that rendomab-B1 recognizes recombinant and naturally expressed hETBR with the same high affinity (Fig. 2C, inset). Since rendomab-B1 behaved similarly with CHO and HEK-hETBR cells, further characterization experiments were performed on CHO-hETBR cells (unless otherwise stated), which are easier to manipulate compared with HEK-hETBR cells.

Using human ETAR-stably transfected CHO cells (kindly provided by Dr M. Iglarz, Actelion, Paris, France), we then showed that rendomab-B1 did not cross-react with hETAR, despite 63% sequence identity. Finally, using ELT3 mouse cells expressing both ETAR and ETBR (received as a generous gift from Dr. Z. Tanfin), we found that rendomab-B1 did not recognize any murine ET-1 receptor (not shown). For all the above-mentioned experiments, the expression of endothelin receptors at cell surfaces was systematically checked using fluorescein-labeled ET-1 (ET-1-FAM, Fig. 2A, upper panel and data not shown).

Rendomab-B1 inhibits ET-1 binding to hETBR, behaving as a mixed non-competitive inhibitor. The interference of rendomab-B1 with endothelin binding to hETBR was evaluated in competition experiments using flow cytometry. As shown in Figure 3A, rendomab-B1 inhibits ET-1-FAM binding to hETBR and, interestingly, the inhibition potency of rendomab-B1 was almost 3-fold higher than that of the reference specific hETBR inhibitor peptide, BQ788 (IC_{50} of 22 vs. 63 nM, respectively). Conversely, endothelins (ET-1, ET-2, ET-3) are able to prevent rendomab-B1 binding with the same potency, slightly higher than that of sarafotoxin 6c (Fig. 3B). The competition between rendomab-B1 and ET-1 was also demonstrated by confocal microscopy experiments in which rendomab-B1 staining on hETBR-expressing CHO cells was largely attenuated by ET-1 addition (Fig. 3C).

The mechanism of these mutual binding inhibitions was then investigated through flow cytometric experiments in which both

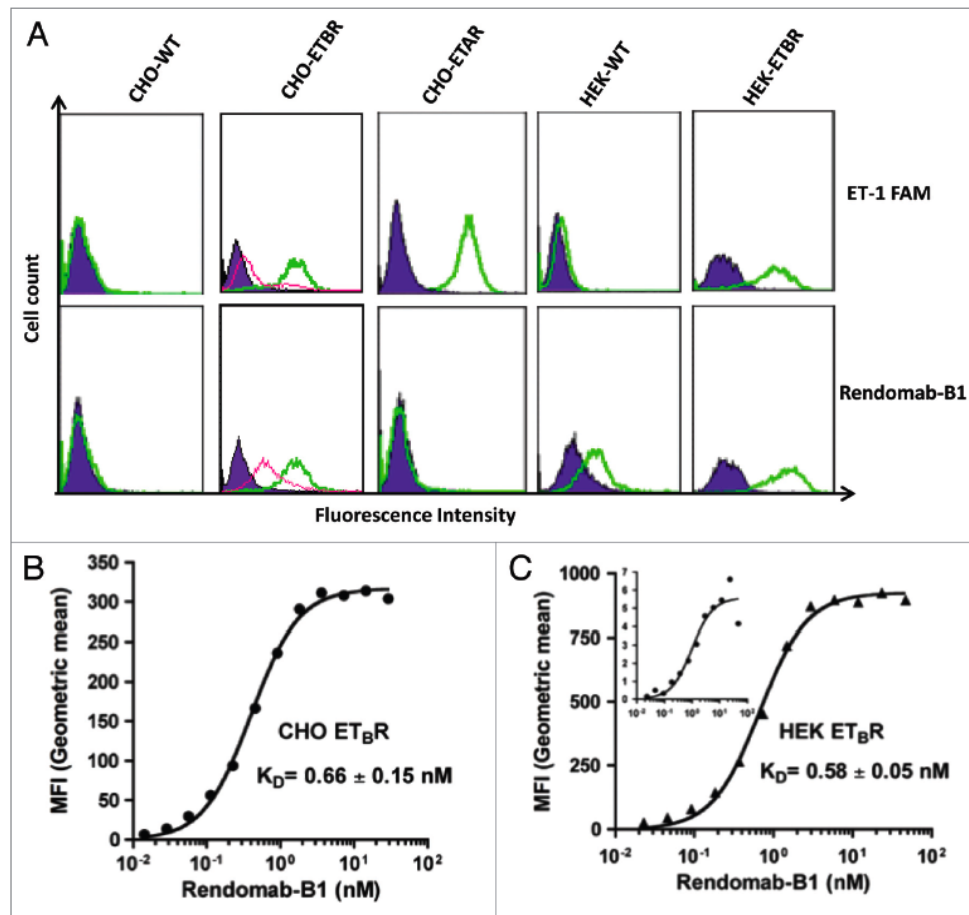


Figure 2. Rendomab-B1 recognizes native hETBR in recombinant cell lines with a subnanomolar affinity. (A) Cells were incubated with 50 nM rendomab-B1 and signals were revealed with R-PE-labeled goat anti-mouse polyclonal antibodies (green histograms, lower panel). Pink histograms stand for hETBR siRNA transfected cells. To check hETBR expression at cell surfaces, cells were exposed to ET-1-FAM (green histograms, upper panel). Shaded violet histograms correspond to cells incubated with buffer alone (upper panel) or with 50 nM of an isotype control antibody (lower panel). (B and C) To evaluate rendomab-B1 affinity, increasing concentrations of rendomab-B1 were incubated with CHO-hETBR (B), HEK-hETBR (C) or WT HEK cells (C, inset), for 24 h at 4°C. Rendomab-B1 binding was measured by flow cytometry, and resulting binding curves, corresponding to mean fluorescence intensity (MFI) as a function of antibody concentrations, were plotted and fitted using GraphPad Prism software. Dissociation constants (K_D) correspond to the mean \pm s.d. of five independent experiments.

rendomab-B1 and ET-1 concentrations were varied. As shown in Figure 4A, ET-1 has a negative effect on both maximal binding and apparent affinity of rendomab-B1. Scatchard analysis of these data, displaying a pattern of intersecting lines at a single point below the x axis, confirmed a mixed non-competitive mechanism (not shown). Conversely, Figure 4B shows that maximal binding and apparent affinity of ET-1 were both lowered by increasing concentrations of rendomab-B1. These results indicate that ET-1 and rendomab-B1 behave as mixed non-competitive inhibitors toward each other, and thus suggest that they recognize distinct sites on hETBR.

Rendomab-B1 exerts pharmacological effects not only by competing with ET-1 but also by triggering rapid internalization

of hETBR. Since rendomab-B1 was able to antagonize hETBR with high potency, we then tested whether the antibody could modulate hETBR pharmacology in CHO cells. As illustrated in Figure 5A and B, rendomab-B1 potently antagonizes the intracellular calcium influx induced by 2 nM ET-1, and even completely blocks it at a concentration of 200 nM. Interestingly, rendomab-B1 concentration leading to 50% loss in calcium mobilization (IC_{50}) was three times lower than that of the reference antagonist BQ788 (45 vs. 136 nM).

In these experiments, it is important to note that the inhibitors (rendomab-B1 and BQ788) were pre-incubated with cells at 37°C, 2 h before ET-1 stimulation. As a consequence, the antagonist property of rendomab-B1 could be due, at least in part, to

the induction of hETBR internalization. To address this issue, we performed confocal microscopy experiments to localize hETBR in cells, following rendomab-B1 addition and subsequent incubation at 37°C or at 4°C for 2 h. As shown in Figure 5C, the localization of rendomab-B1 staining changed depending on the incubation temperature. When rendomab-B1 was incubated for 2 h at 4°C (left panel), the staining was essentially membrane-located. Conversely, incubation at 37°C led to the appearance of numerous intracellular spots that partly colocalized with the early endosomal marker EEA1 (Fig. 5C, right panel). Therefore, these data indicate that the inhibition observed in the calcium influx assay (with a 2 h preincubation) is at least partly due to rendomab-B1-induced hETBR internalization, which desensitizes cells to ET-1.

To assess whether rendomab-B1 is able to block the ET-1-induced calcium signaling pathway independently of its capacity to induce hETBR internalization, we varied its pre-incubation time with cells preceding ET-1 addition (Fig. 5D). Interestingly, a pre-incubation time as short as one minute was sufficient to strongly inhibit the intracellular calcium release (90% loss), similarly to 2 h pre-incubation. This one-minute pre-incubation with rendomab-B1 (not sufficient to induce hETBR internalization) proves that rendomab-B1 is able to block the ET-1-induced calcium influx regardless of hETBR internalization. However, we did not observe any inhibition when rendomab-B1 and ET-1 were simultaneously added to the cells, in contrast to what is observed with BQ788. This result can be explained by the large size of the antibody compared with BQ788 (150 kDa vs. 664 Da), which prevents rendomab-B1 from reaching the receptor before ET-1 and antagonizing the signaling pathway.

Finally, we performed additional experiments to directly demonstrate the internalization of hETBR induced by rendomab-B1 in CHO-hETBR cells and to compare its efficiency to that induced by ET-1 itself. CHO-hETBR cells were pre-incubated during 2 h at 37°C in the presence of rendomab-B1, or a control antibody (same isotype as rendomab-B1), or unlabeled ET-1, or in the absence of any compound (in the buffer alone). Afterwards, cells were rinsed and kept in the presence of ET-1-FAM for 30 min at 4°C before flow cytometry analysis. As shown in Figure 5E, pre-incubations in the presence of rendomab-B1 or ET-1 considerably lowered the membrane labeling, whereas labeling observed after exposure to the control antibody remained identical to that obtained when cells were kept for 2 h in the buffer alone. This result clearly indicates that rendomab-B1 triggers hETBR internalization in CHO cells, almost as efficiently as ET-1, which could actually contribute to its antagonist effect.

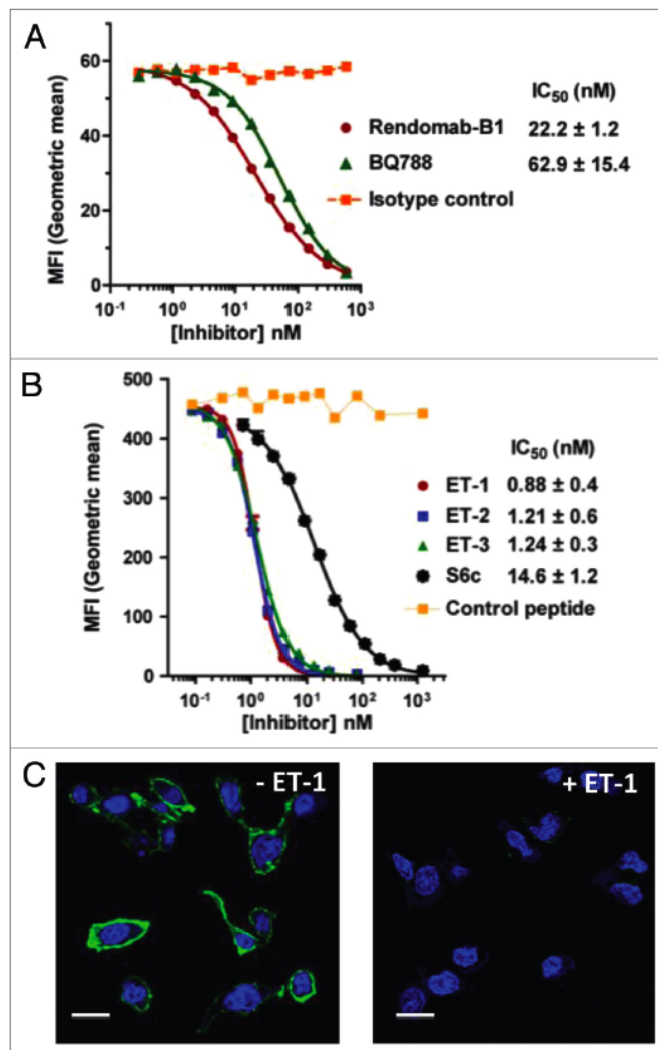


Figure 3. Rendomab-B1 inhibits ET-1 binding to hETBR and conversely. (A) CHO-hETBR cells were incubated simultaneously with 10 nM ET-1-FAM and varying concentrations of rendomab-B1, BQ-788 or isotype control antibody. ET-1-FAM binding was measured using flow cytometry. (B) CHO-hETBR cells were incubated simultaneously with 3 nM rendomab-B1 and varying concentrations of ET-1, ET-2, ET-3, sarafotoxin 6c (S6c) or 21-amino-acid control peptide. Rendomab-B1 binding was quantified by flow cytometry. The inhibition binding curves (A and B) are plots of MFI values vs. inhibitor concentrations. Curves were fitted using GraphPad Prism with the adequate dose-response equation and IC₅₀ ± s.d. of three independent tests are presented. (C) Confocal experiments: viable CHO-hETBR cells were stained with 50 nM rendomab-B1 (left picture) or with a combination of 50 nM rendomab-B1 plus 1 μM ET-1 (right picture). Nuclei were counterstained with DRAQ5 (blue). White bars = 10 μm.

Together, these findings demonstrate that rendomab-B1 is able to completely block the ET-1-induced calcium signaling pathway by directly competing with ET-1 binding to hETBR

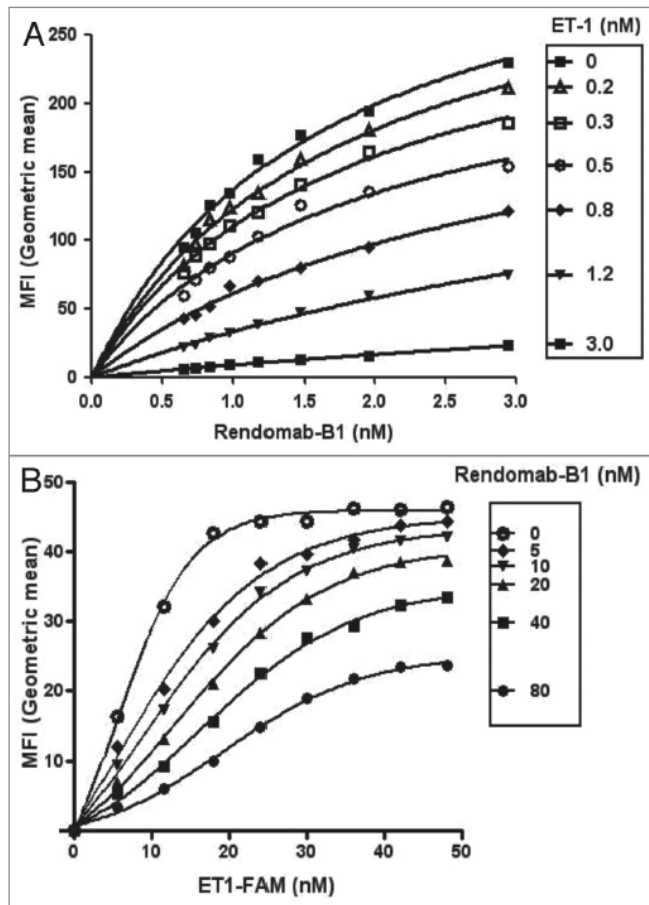


Figure 4. Randomab-B1 behaves like a non-competitive inhibitor of ET-1 toward hETBR. (A and B) Both ET-1 and randomab-B1 concentrations were varied and added simultaneously to CHO-hETBR cells. After 24 h incubation at 4°C, randomab-B1 binding (using FITC-labeled antibody) in the presence of increasing concentrations of unlabeled ET-1, or ET-1 binding (using FAM-labeled peptide) in the presence of unlabeled randomab-B1, were measured by flow cytometry. Resulting binding curves are presented in (A) and (B), respectively. Data were fitted using GraphPad Prism software. The experiments were repeated three times.

and by triggering rapid hETBR endocytosis leading to cell desensitization to ET-1 stimulation.

Randomab-B1 recognizes a discontinuous epitope composed of three extracellular sequences of hETBR. To gain more insight into the randomab-B1 binding site on hETBR, we undertook an epitope mapping analysis using a set of 147 overlapping dodecapeptides, frameshifted by one amino acid, and corresponding to the hETBR three extracellular loops (E1, E2 and E3) and N-terminal tail. Incubation of the membrane with randomab-B1 revealed three discontinuous linear immunoreactive regions: two located within the N-terminal tail and one covering the main part of the second extracellular loop (Fig. 6A–C). More precisely, immunoreactive spots J₂₁ to K₁₀ and K₂₂ to L₁₁ match amino acid

residues 45–69 and 70–94 of the N-terminal domain, whereas spots N₁₁ to N₁₃ and O₆ to O₁₃ correspond to amino acids 251–277 of the E2 loop. Interestingly, the most intensely stained consecutive spot series (O₆ to O₁₃), which encompassed residues ²⁵⁹PVQ KTA FMQ FYK TAK DWW L₂₇₇, showed a correlation between the staining intensity and the appearance of the “KTA” sequence, with a peak signal (spot O9) when the two motifs “KTA” and “KTAK” were present in the dodecapeptide (Fig. 6D). Thus, the peptide sequence corresponding to the spot O9 and especially the “KTA” motif seems to be a major determinant for randomab-B1 binding. More importantly, the fact that randomab-B1 interacts with three linear regions located within distinct extracellular domains (N-terminal tail and E2 loop), without any sequence similarity, suggests that randomab-B1 might recognize a conformational epitope. This assumption is reinforced by binding experiments showing that randomab-B1 affinity for hETBR is strongly impaired when cells overexpressing the receptor are fixed by 4% paraformaldehyde, by the fact that randomab-B1 proved to be ineffective in probing hETBR in western blot tests and finally by the observation that the antibody was unable, under our experimental conditions, to bind any epitope peptide that we synthesized and coated alone or in combination on a 96-well plate (data not shown).

Randomab-B1 triggers internalization of hETBR in HUVECs, reduces cell viability and leads to hETBR mRNA downmodulation. In humans, ETBR is mainly expressed by vascular endothelial cells and activated by ET-1 in an autocrine fashion. In this context, we tested whether randomab-B1 was able to bind efficiently to hETBR expressed by human umbilical endothelial cells (HUVECs). As illustrated in Figure 7A, randomab-B1 significantly stained HUVECs, a staining completely inhibited when cells were pre-incubated with sarafotoxin 6c, a specific ligand of hETBR. It is worth noting that randomab-B1 staining on HUVECs was rather weak, probably due to the high amounts of endothelins secreted by these cells, which we estimated as ~100 pM/million cells through a sensitive endothelin ELISA (data not shown). Once bound to membrane receptor, randomab-B1 was able to trigger hETBR internalization in HUVECs as efficiently as ET-1 itself (Fig. 7B), just as it did in CHO-hETBR cells (Fig. 5E).

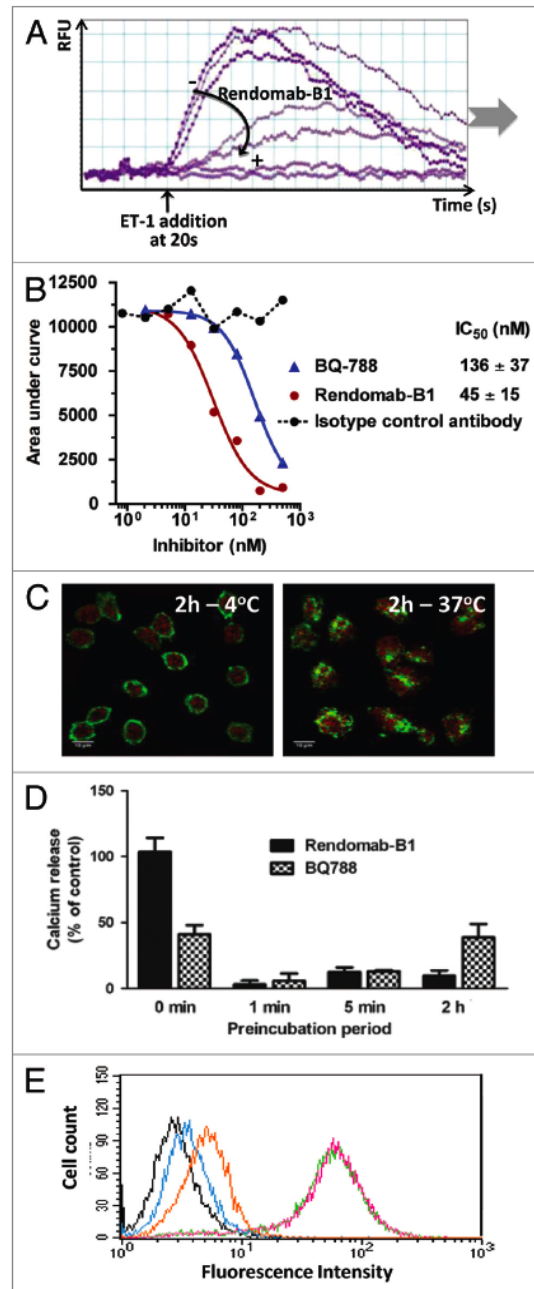
ET-1 has been described as a pro-survival and mitogenic factor for endothelial cells^{30,31} and, as mentioned above, pathophysiological roles of hETBR, namely in cardiovascular diseases and cancers, are frequently linked to its over-stimulation or overexpression in the vascular endothelium. Accordingly, we tested whether randomab-B1 was able to affect HUVEC proliferation/survival by incubating cells with 500 nM randomab-B1 (or BQ788) for several days, before assessing cell viability using the MTT dye. As illustrated in Figure 7C, randomab-B1 induced a sharp decrease in cell viability (65% loss), here again being more

Figure 5. Rendomab-B1 blocks ET-1-induced intracellular calcium mobilization by competing with ET-1 and triggering rapid internalization of h-ETBR. (A) CHO-hETBR cells were loaded with a calcium-sensitive dye for 1 h. One hour before dye loading, cells were treated with various concentrations of rendomab-B1, BQ788 or isotype control antibody. At the end of the dye incubation period, cells were stimulated with 2 nM ET-1 and intracellular calcium fluxes were monitored with a FLEXStation 2 multi-mode reading system. The picture illustrates ET-1-induced calcium flux variations obtained in cells treated with increasing concentrations of rendomab-B1, from 2.5 nM to 500 nM. Calcium flux variations obtained in cells treated with BQ-788 or isotype control antibody are not illustrated here. (B) Data obtained from the FLEXStation (area under curve) were plotted vs. inhibitor concentrations and fitted with an adequate dose-response equation (GraphPad Prism). $IC_{50} \pm$ s.d. stand for three independent assays. (C) Confocal experiments: viable CHO-hETBR cells were stained with 100 nM of fluorescently labeled rendomab-B1 (green signal). Red fluorescence corresponds to early endosomal antigen 1 (EEA1) staining. Merged images are presented. Nuclear staining with DRAQ5 is not displayed. (D) CHO-hETBR cells were treated as in A except that the preincubation period of inhibitors was varied and only one inhibitor concentration was used (200 nM). Error bars stand for mean \pm s.d. of three independent experiments. (E) Flow cytometry experiments: internalization of hETBR induced by rendomab-B1. CHO-hETBR cells were pre-incubated for 2 h at 37°C in the presence of rendomab-B1, or isotype control antibody, or ET-1 (all compounds at 100 nM), or kept in the buffer alone. After rinsing, CHO-hETBR cells were incubated for 30 min at 4°C with 10 nM ET-1-FAM before fluorescence measurement. Pre-incubations in the presence of rendomab-B1 (orange histogram), or ET-1 (blue histogram), or control antibody (pink histogram), or in the buffer alone (green histogram). Basal fluorescence (in the absence of ET-1-FAM): black histogram.

potent than BQ788 (20% loss). A similar result was obtained using an anti-endothelin-1 mAb, confirming the autocrine survival role of ET-1 in HUVECs. Since rendomab-B1 induces hETBR internalization in HUVECs (Fig. 7B), it is possible that the observed decrease in cell viability could be due, at least in part, to this desensitization process.

Finally, we sought to know whether rendomab-B1 could additionally lead to a downmodulation of hETBR expression in HUVECs. As shown in Figure 7D, exposure of HUVECs to rendomab-B1 for 24 h not only completely blocked ET-1-induced hETBR mRNA upregulation (as does BQ 788), but also resulted in an additional 25% reduction in the quantity of hETBR mRNA compared with untreated control cells, this additional decrease not being observed with BQ788.

Rendomab-B1 affinity for hETBR is greatly impaired in melanoma cell lines. As mentioned above, some tumor cells themselves, like melanoma, are known to overexpress hETBR, which favors their proliferation or survival.¹⁷ Accordingly, rendomab-B1 binding was tested on three human melanoma cell lines: UACC257, SLM8 and WM266–4. Amazingly, curves of rendomab-B1 binding to all these melanoma cells displayed very low signals and did not present any plateau (Fig. 8F), unlike those obtained with hETBR transfected cells (Fig. 8E), which reflects a poor affinity for melanoma and renders apparent affinity calculations imprecise (inset, Fig. 8). This result is all the more surprising because we checked that ET-1-FAM labels the three cell lines in a saturable fashion (Fig. 8B), with similar affinities to those obtained with hETBR transfected cell lines (Fig. 8A and inset), clearly demonstrating the presence of functional



endothelin receptors at the surface of melanoma cell lines. To ensure that ET-1-FAM binding was indeed due to hETBR expression, we confirmed that the signals obtained were inhibited by BQ788 and sarafotoxin 6c (specific hETBR antagonist and agonist, respectively), but not by FR139317, an hETAR specific antagonist (data not shown). Finally, the hypothesis of a possible competition between rendomab-B1 and endothelins secreted by

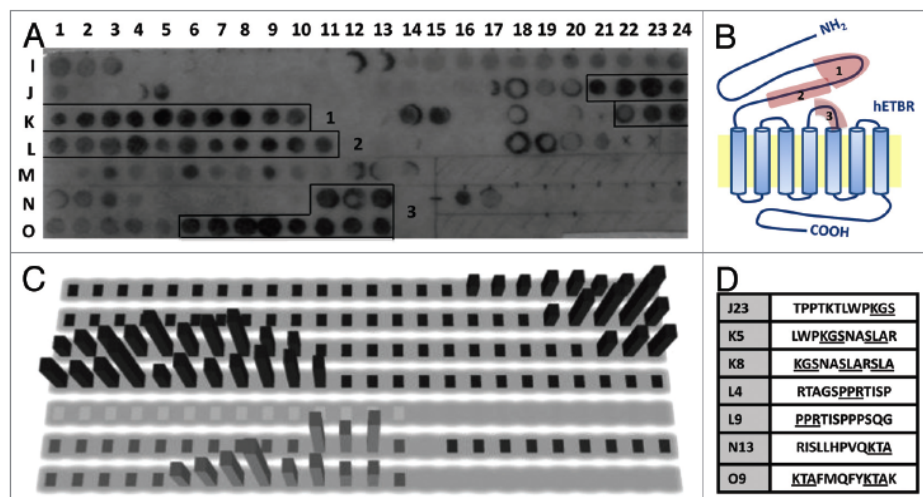


Figure 6. Rendomab-B1 recognizes a discontinuous epitope on hETBR, involving N-terminal tail and E2 loop regions. (A) Rendomab-B1 epitope was investigated using a Pepsan membrane spotted with dodecapeptides (frameshifted by one amino acid) covering the entire hETBR extracellular regions. Interacting peptides were revealed using an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody. (B) Schematic localization of the regions recognized by rendomab-B1 on hETBR. (C) Spot signals obtained on the membrane were quantified by densitometry. Isolated (no more than two consecutive) spots, as well spot series not presenting any signal peak higher than three times the background, are not represented and were considered as irrelevant. (D) Table mentioning the sequence of most intensely stained spots on the membrane. Underlined motifs correspond to putative key residues for rendomab-B1 binding. This experiment was done twice with two independent membranes. An isotype control antibody did not generate any staining.

melanoma cells, which could explain an absence of significant antibody binding, was very unlikely since no endothelin-like immunoreactivity was detected in cell culture medium using a picomolar-range sensitive endothelin ELISA (data not shown).

To clarify this unexpected rendomab-B1 behavior on melanoma cells, we used the anti-hETBR polyclonal antisera generated during the immunization procedure. As shown in Figure 8C and D and inset, anti-hETBR polyclonal antisera recognized both CHO-hETBR cells and melanoma cells similarly. This indicates that the specificity of rendomab-B1 is very peculiar and clearly not representative of the specificities of most anti-hETBR antibodies present in the antisera. It is also worth noting that polyclonal antisera saturating signals (B_{MAX}) obtained with hETBR-transfected cells and melanoma were similar (Fig. 8C and D), whereas corresponding saturating signals obtained with ET-1-FAM were very different (Fig. 8A and B), which suggests a functional or a structural heterogeneity of hETBR at the surface of melanoma, only a small proportion of receptors in these tumor cells being able to bind ET-1.

Discussion

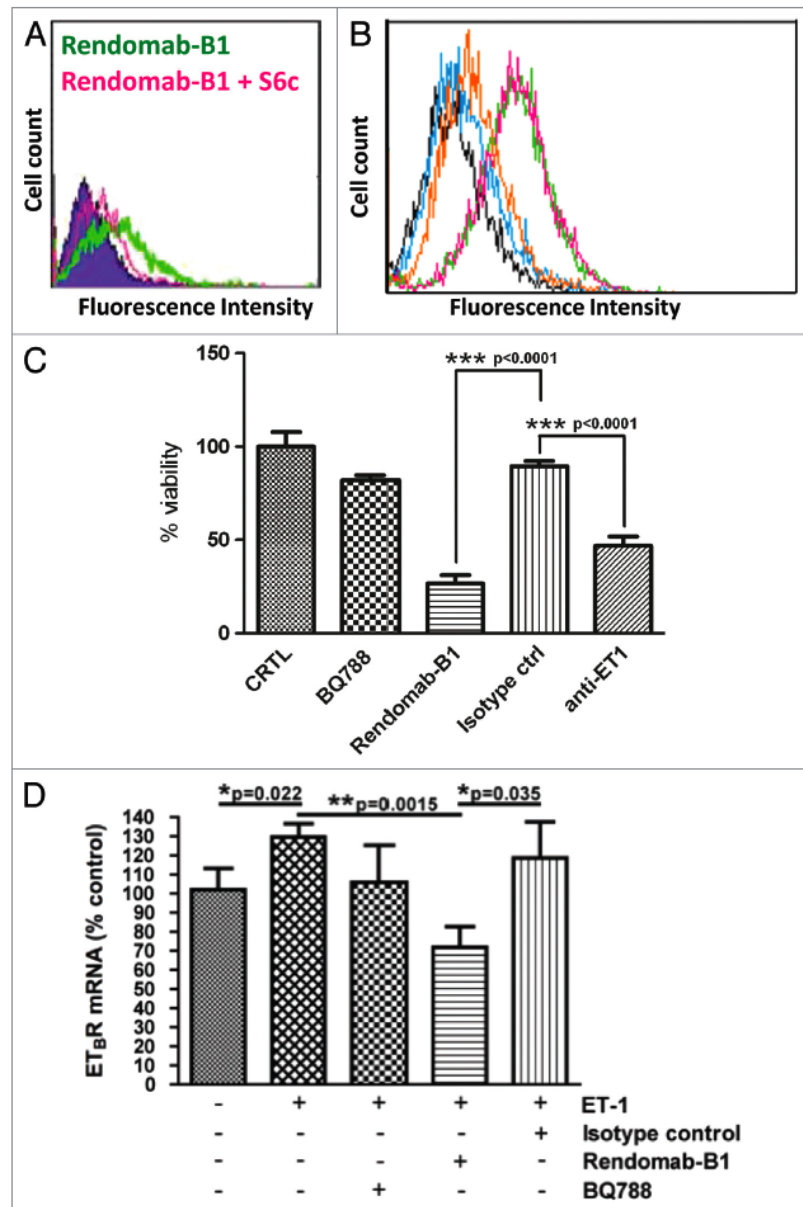
G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute the largest family of cell surface signaling proteins, with approximately 900 members, accounting for more than 2% of the genes identified in the human genome.³² These receptors have a pivotal role in a broad range of physiological functions and in some of the most prevalent human disorders, as reflected by the fact that about one

third of all marketed therapeutics act on GPCRs.^{33,34} Despite their relevant role in various human diseases, no GPCR-targeting therapeutic antibodies have been approved so far. In this study, we describe the production and the characterization of a new mAb targeting and potentially inhibiting a therapeutically relevant GPCR, the human endothelin B receptor, which has been implicated in several diseases, including cardiovascular diseases and cancers.

The generation of pharmacologically active antibodies recognizing the native conformation of GPCRs is not an easy task, and peptide immunizations using GPCR extracellular fragments or purified receptors sometimes result in antibodies unable to bind the receptor in its membrane context, as emphasized in a recent review.²⁴ To bypass this major problem, which arises from the difficulty of producing large quantities of stable and correctly folded GPCRs, we used an electroporation-aided DNA immunization approach involving in vivo immunogen production and folding. As previously described by different groups^{27,28,35,36} including ours,^{29,37} this technique has been successfully used to generate polyclonal and monoclonal antibodies against the native conformation of GPCRs. The advantage of this technique is once more illustrated in the present study, since we obtained 27 mAbs recognizing native hETBR. The fact, however, that only one antibody, rendomab-B1, was able to potentially antagonize the receptor emphasizes the fact that obtaining a pharmacologically active antibody still remains a difficult technical challenge.

Experiments using flow cytometry and hETBR stably transfected cell lines demonstrated that rendomab-B1 was highly

Figure 7. Rendomab-B1 triggers hETBR internalization in HUVECs, impairs cell viability and leads to hETBR mRNA down-modulation. (A) Specific rendomab-B1 binding to HUVECs as revealed by flow cytometry. HUVECs were incubated with 100 nM rendomab-B1 (in green histogram) or isotype control antibody (violet histogram). Staining specificity was checked by pretreating cells for 1 h at 37°C with 500 nM sarafotoxin 6c (S6c). (B) Internalization of hETBR induced by rendomab-B1. HUVECs were pre-incubated for 2 h at 37°C in the presence of rendomab-B1, or isotype control antibody, or ET-1 (all compounds at 100 nM), or kept in the buffer alone. After rinsing, HUVECs were incubated for 30 min at 4°C with 10 nM ET-1-FAM before flow cytometry analysis. Pre-incubations in the presence of rendomab-B1 (orange histogram), or ET-1 (blue histogram), or control antibody (pink histogram), or in buffer alone (green histogram). Basal fluorescence (in the absence of ET-1-FAM): black histogram. (C) HUVECs were grown for several days in a reduced-serum medium containing rendomab-B1, BQ788, anti-ET-1 antibody or isotype control antibody, all compounds at the same concentration (500 nM). Cell viability was then assessed using the MTT tetrazolium salt. Data are presented as percentage viability compared with untreated control cells. (D) HUVECs were treated for 24 h with rendomab-B1, BQ788 or isotype control antibody (all at 500 nM) in combination with 10 nM ET-1. Thereafter, hETBR mRNA was amplified by RT-PCR. Bands were quantified by densitometry analysis and values normalized to control conditions. Error bars represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. *, ** stand for $p < 0.05$, 0.01 , respectively, for Student's t test.



specific for human ETBR and did not cross-react with hETAR, the second endothelin receptor subtype identified in mammals. This restrictive specificity is an interesting feature that supports the use of mAbs to selectively target GPCRs without interfering with other family members, a problem often encountered with small molecules directed against GPCRs.^{22,34} The apparent affinity of rendomab-B1 for ETBR was found to be remarkably high (around 600 pM) which is a favorable point for future possible diagnostic or therapeutic applications. More importantly, we demonstrated that rendomab-B1 competed with ET-1 binding to hETBR with almost three times greater efficacy than BQ788, the reference ETBR specific inhibitory compound. Moreover, pharmacological assays revealed that rendomab-B1 was a potent hETBR antagonist (once again three times better than BQ788)

able to silence completely the ET-1-induced IP3-calcium signaling pathway. Since it has been very recently reported³⁸ that, upon ETBR binding, ET-1 can trigger additional signaling pathways (e.g., β arrestin-1 and c-Src activation), it would be interesting to investigate whether rendomab-B1 could also antagonize these alternative pathways.

To further investigate the inhibitory mechanism of rendomab-B1, we undertook competitive binding experiments, as frequently used to characterize the mechanism of enzyme inhibitors.³⁹ Our results demonstrate that rendomab-B1 behaves as a

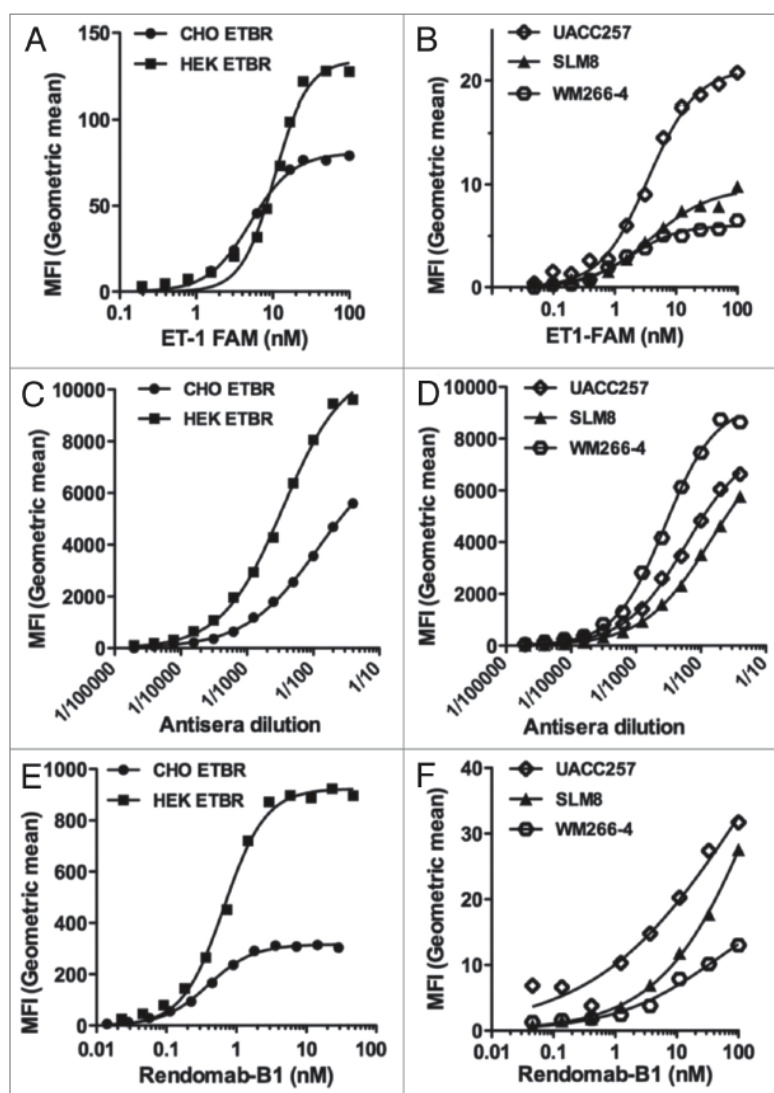


Figure 8. Rendomab-B1 poorly recognizes hETBR expressed by human melanoma cell lines. (A and B) hETBR transfected cells and human melanoma cells (UACC257, SLM8, WM266-4) were incubated with varying concentrations of ET-1 FAM for 24 h and analyzed by flow cytometry. (C and D) Cells were stained with varying concentrations of anti-hETBR polyclonal sera before flow cytometry analysis. (E and F) Cells were stained with varying dilutions of rendomab-B1 and resulting fluorescence was measured by flow cytometry. All binding curves (MFI vs. concentrations) were analyzed with GraphPad Prism to collect binding parameters presented in the table. Dissociation constants represent the mean \pm s.d. of at least 4 independent experiments.

non-competitive inhibitor, implying that it possibly recognizes an extracellular region of hETBR that is structurally distinct from, but functionally related to, the ET-1 binding site. In fact, using a Pepscan analysis, rendomab-B1 epitope was mapped to three discontinuous hETBR extracellular regions, located within the N-terminal tail and the E2 loop. This indicates that rendomab-B1 actually recognizes a conformational epitope that might arise from

however, was able to compete efficiently with ET-1 and thus remained without any pharmacological activity. Together, these observations clearly show that rendomab-B1 is a unique molecular tool, harboring original and unprecedented pharmacological properties in the field of anti-ETBR mAbs.

In pathological conditions, ETBR overexpression or overstimulation in the tumor-surrounding vascular endothelium, and

the interaction between the N-terminal tail and the E2 loop in the folded hETBR receptor, as already suggested for other mAbs recognizing different noncontiguous regions on their respective membrane targets.^{40,41} Collectively, these findings highlight the value of rendomab-B1 in investigating hETBR structure and in gathering more information about the location of the endothelin binding site, whose precise delineation is still unclear despite several recent publications tackling the issue.^{42,43} Furthermore, this original non-competitive inhibitory mechanism, rarely found for small inhibitory molecules like BQ788 that generally compete with natural ligands for the receptor orthosteric site, underlines the value of developing therapeutic antibodies that offer the possibility of targeting original epitopes on GPCRs, potentially linked to new pharmacological activities and better receptor selectivity.²²

To our knowledge, this is the first time that an antagonist antibody (mAb) mAb targeting hETBR has been described. Several groups have already reported the production of ETBR-specific mAbs,⁴⁴⁻⁴⁶ but none of them showed any direct pharmacological activity on this receptor. Kondoh et al.⁴⁴ were the first to produce ETBR- (and also ETAR-) specific mAbs using rat lung membranes as immunogen; however, no proof of ETBR cell surface labeling was mentioned. More than 10 y after, Yamaguchi et al.⁴⁵ reported the production of five mAbs recognizing hETBR in its membrane context. Nevertheless, the authors did not comment on any competition with natural ligands. Finally, a very recent publication by Asundi et al.⁴⁶ nicely presents the production and characterization of two mAbs specifically targeting hETBR. These antibodies, obtained through two independent cell fusions after different immunization protocols, recognized both recombinant hETBR and several melanoma cell lines, unlike rendomab-B1. None of them,

more generally in stromal cells near tumors, has been involved in pivotal steps of cancer progression including neovascularization,¹² immune system escape¹⁴ and metastatic spread.¹⁵ Since multiple cancer cells overexpress ET-1,^{47,48} a deleterious paracrine loop promoting tumorigenic effects is thus established. In this context it is very interesting that, at least in HUVECs used here as a model of endothelial cells, rendomab-B1 appears not only able to antagonize the ET-1/hETBR-mediated effect (as reflected by the large drop in HUVEC viability when exposed to rendomab-B1), but also to completely block ET-1-induced hETBR expression (as reflected by a large reduction in hETBR mRNA in endothelial cells incubated in the presence of rendomab-B1), both effects being possibly explained, at least in part, by hETBR internalization triggered by this mAb. Since preliminary results indicate that rendomab-B1 is also able to recognize other endothelial cells naturally expressing hETBR (e.g., immortalized human cerebral endothelial cells hCMEC/D3 and vascular endothelial cells in patients suffering from low grade-glioma; Drs. P.O. Couraud, Institut Cochin, and J.P. Hugnot, INSERM, Institute of Neuroscience, respectively, unpublished observations), the present data could be considered together as a proof of principle for the use of rendomab-B1 for breaking the vascular hETBR-mediated tumor-promoting vicious circle described above, hopefully with greater efficiency than BQ-788. These results are also promising in the context of other diseases involving the dysregulation of hETBR in the vascular wall.⁴ For instance, rendomab-B1 could serve as a diagnostic tool for imaging endothelial hETBR in some vascular diseases in humans (Dr. L. Mouthon, Hôpital Cochin, unpublished observations), and perhaps as a therapeutic tool whenever endothelin receptors have to be efficiently blocked. Of course, such a potential use would require chimerization or humanization of rendomab-B1 and the further analysis of the binding properties of these derived compounds.

Finally, the unexpected observation that rendomab-B1 poorly recognizes hETBR on melanoma cell lines strongly suggests that hETBR expressed by these latter cells presents tumor-specific structural characteristics. The poor affinity of rendomab-B1 for hETBR in a tumor context could be explained by the N-terminal proteolysis of hETBR.⁴⁹ Indeed, hETBR has been shown to undergo a ligand-induced metalloproteinase cleavage at R64-S65 in transfected HEK and vascular smooth muscle cells.^{50,51} Under our experimental conditions, no endothelin secretion by melanoma cell lines was detected, thus precluding a massive agonist-induced cleavage of the hETBR pool at the cell surface. However, it would not be surprising that these highly invasive cells overexpress some metalloproteinases⁵² that could subsequently cut the hETBR N-terminal extremity and impair rendomab-B1 binding. This hypothesis is supported by the fact that the rendomab-B1 epitope was found to involve a region located in the N-terminal truncated portion (I45 to A69). Moreover, it is worth noting that none of the three hETBR extracellular regions mapped by rendomab-B1 match the major epitope motif of anti-hETBR polyclonal antibodies raised during the immunization procedure, which strongly stained melanoma cells.²⁹ Interestingly, the epitope of hETBR-specific polyclonal antisera (S65 to P81) was located just after the proteolytic site. Therefore, hETBR cleavage,

which might occur in highly invasive melanoma cells, seems to be a relevant hypothesis to account for the poor rendomab-B1 binding to these cells. Since chimeric hETBRs harboring a modified E2 loop (in which E2 loop has been replaced by the corresponding region in hETAR, with no sequence homology) are not recognized by rendomab-B1 (unpublished results), it might be envisaged that an alteration of this major rendomab-B1 epitope could also occur in tumor cells, a possibility which would be in agreement with the fact that polyclonal antisera are not directed against this epitope.²⁹ Nevertheless, other hypotheses involving hETBR splicing variants^{53,54} oligomerization⁵⁵ or abnormal glycosylation pattern could still explain the poor rendomab-B1 binding to melanoma cell lines. To our knowledge though, this is the first time that hETBR, at the protein level, has been reported to differ structurally between melanoma cells and non-cancerous cells. Furthermore, our results suggest that the hETBR pool at the surface of melanoma cells is heterogeneous, the total amount of receptors (revealed with polyclonal antisera) being comparable or even higher in melanoma than in recombinant cells, whereas the quantity of functional receptors (able to bind ET-1-FAM) is much lower in melanoma. Finally, it is rather interesting to note that rendomab-B1 is also unable to bind hETBR in glioblastoma cell lines (J.P. Hugnot, INSERM, Institute of Neuroscience, unpublished observations), suggesting that similar structural changes between normal and "tumor" receptors may occur in different cancer cells.

In conclusion, this study has presented the production and characterization of a new mAb that selectively recognizes and antagonizes hETBR, a relevant but as yet underexploited therapeutic target. Our results highlight the fact that rendomab-B1 harbors very original characteristics compared with previously reported anti-hETBR antibodies. To our knowledge, rendomab-B1 is the first pharmacologically active anti-hETBR mAb with strong antagonist properties. Notably, the rendomab-B1 blocking activity observed with HUVECs can be simply regarded as a promising first step toward a potential utilization of this mAb for therapeutic indications where endothelium hETBR blockade would be beneficial, as in cancers or some cardiovascular disorders. Furthermore, rendomab-B1 characterization uncovered the fact that hETBR is likely structurally different when expressed by melanoma cells vs. non-cancerous cells. This very interesting finding emphasizes the value of rendomab-B1 in the detection and further characterization of the structural features of melanoma-expressed hETBR, but also paves the way for the development of mAbs specifically recognizing the "melanoma-specific" (may be extendable to other cancers) form(s) of hETBR. Therefore, rendomab-B1 appears as a very attractive molecular tool to antagonize pathological hETBR signaling, and to investigate hETBR molecular structure, distribution and roles in both human health and diseases.

Materials and methods

Animals. Six-week-old female C57BL/6 mice from Janvier were kept in a specific pathogen-free animal facility. All animal experiments complied with French animal experimentation regulations.

Plasmids. The cDNA clone of the human ETBR (a generous gift from Dr. M.J. Brownstein) was subcloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen). The integrity of the construct was confirmed by sequence analysis. Silencer select siRNAs targeting human ETBR were from Ambion. Dr. P. Robin kindly provided the plasmid containing the cDNA of the rat ETBR.

Transfection experiments and cell cultures. CHO cells (ECACC) were cultured in Ham-F12 medium, HEK293T (EACC) in DMEM medium and human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs; Lonza) in EBM-2 medium containing endothelial cell growth supplements. Melanoma cell line SLM-8 was a kind gift from Dr M. Viguier, Hôpital Saint Louis). UACC257 and WM266-4 cell lines were from NCI-60 and ECACC, respectively. All melanoma cell lines were cultured in DMEM/F-12 medium except for UACC257, which was grown in RPMI1640. All media were supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. All media and cell culture supplements were from Invitrogen. The cDNA for ETBR was transfected and stably overexpressed in CHO and HEK cells using FUGENE HD reagent (Roche Diagnostics). Human ETAR stably transfected CHO cells were kindly provided by Dr. M. Iglarz (Actelion). Stably transfected cells with human ETBR or ETAR are termed CHO-hETBR, CHO-hETAR or HEK-hETBR.

DNA immunization protocol and production of monoclonal antibodies. DNA immunizations were done according to a previously described protocol.²⁹ For mAb production, the two mice presenting the highest amount of specific antibody received three final cellular boosts with HEK-hETBR cells (5 × 10⁶ cells in 200 µL i.p., one boost per day) 3 d prior to sacrifice. Collected splenocytes were fused to NS1 mouse myeloma cells as previously described.⁵⁶ Hybridoma supernatants were screened for production of anti-hETBR specific antibodies by a living cell-based ELISA test,²⁹ using both untransfected and CHO-hETBR cells as targets. Specificity and reactivity of antibodies were further confirmed by flow cytometry. All hybridomas were subcloned by limiting dilutions. Antibodies were isotyped using a mouse immunoglobulin isotyping kit according to the manufacturer's (Pierce) instructions and purified by affinity chromatography on Protein A-Sepharose (Millipore).

Flow cytometric analysis. Rendomab-B1 specificity and cross-reactions. For the determination of hETBR specific antibody binding, flow cytometric analysis was performed on seven cell culture models: wild-type CHO, HEK and HUVEC cell lines and stably transfected cell lines (CHO or HEK) with either hETAR or hETBR. Confluent cells in 75-cm² flasks were washed with phosphate buffer saline (D-PBS, Invitrogen) and collected after incubation at 37°C for 15 min with 3 mL of versene buffer (D-PBS/8 mM EDTA). Cells were then seeded (100,000 cells/well) onto V-shaped 96-well plates (Greiner Bio One). Plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were incubated for 2 h at 4°C with 100 µL of D-PBS/0.1% BSA/5% normal goat serum (NGS, Invitrogen) containing 50 nM rendomab-B1. After two washes with 150 µL of ice-cold D-PBS/0.1% BSA/1%

NGS, cells were incubated for 1 h at 4°C in the dark with R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H'L) (Jackson ImmunoResearch). Cells were washed twice again and resuspended in 100 µL of D-PBS/0.1% BSA. The fluorescence was finally assayed using a GUAVA flow cytometer (Guava EasyCyte Plus, Millipore) and mean fluorescence intensity (MFI) of samples was measured. To control hETBR expression at cell surfaces, fluorescein-labeled ET-1 (ET-1 FAM, Phoenix Pharmaceuticals) was used. In some experiments, cells (melanoma cell lines) were pre-incubated with the specific ETAR antagonist FR139317 (Tocris) to exclusively measure ET-1 FAM binding on hETBR.

Affinity determination and competition experiments. For affinity measurements, saturation binding experiments were performed with increasing concentrations of rendomab-B1. Concerning competition tests, CHO-hETBR cells were incubated either with (1) fixed FITC-labeled rendomab-B1 concentration (3 nM) and varying concentrations of competitor peptides ET-1, ET-2, ET-3 or sarafotoxin 6c (Phoenix Pharmaceuticals) or with (2) fixed ET-1 FAM concentration (10 nM) and varying concentrations of rendomab-B1 or BQ788 (Phoenix Pharmaceuticals). For experiments investigating the rendomab-B1 competition mechanism, cells were incubated with varying concentrations of both rendomab-B1 and ET-1. Experiments were done at 4°C to avoid receptor internalization and overnight incubation permitted equilibrium to be reached.

Confocal microscopy analysis. Confocal microscopy analysis was performed on two cell culture models: the CHO-hETBR and the HEK-hETBR cells, following the method described previously.²⁹ For competition experiments, 50 nM rendomab-B1 was incubated simultaneously with 1 µM ET-1. For internalization experiments, unfixed cells were incubated at 4°C for 1 h with 100 nM of DyLight-488-labeled rendomab-B1, washed twice with D-PBS, and either kept at 4°C or returned to 37°C for 2 h before a fixation step with 4% PFA. Cells were next permeabilized with 0.5% saponin (Sigma) to stain the endosomal compartment, using anti-EEA1 antibody (Millipore).

Calcium influx assays. For calcium influx, 35,000 CHO-hETBR cells were plated on 96-well black-sided plates with a clear bottom and incubated at 37°C, 5% CO₂. After 24 h, medium was aspirated and cells were loaded with a calcium-sensitive dye for 1 h at 37°C using the Fluo8 NW assay kit recommendations (AAT Bioquest). Inhibitors (rendomab-B1, BQ788, isotype control antibody) were added 1 h before dye loading. The plate was then loaded onto the FLEXStation 2 multi-mode microplate reader (Molecular Devices) to obtain real-time monitoring of the calcium mobilization upon addition of 2 nM ET-1.

Viability assay in endothelial cells (HUVEC). 2,500 HUVECs were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37°C, 5% CO₂. Cells were washed twice with D-PBS and incubated for 4 d in a reduced serum medium containing 500 nM rendomab-B1, isotype control antibody or BQ788. At the end of the incubation period, cells were observed with a microscope and viability was assayed with the MTT tetrazolium salt (Sigma): cells were incubated with 0.5 mg/mL of MTT for 1 or 2 h and then resuspended with 100 µL of DMSO. Viability was

then determined by measuring the absorbance at 570 nm with a spectrophotometer.

mRNA PCR. mRNAs were prepared, reverse-transcribed and amplified as previously described.²⁹ Primer sequences used to amplify human ETBR were: 5'-GCA CAT CGT CAT TGA CAT CC-3' and 5'-CAG AGG GCA AAG ACA AGG AC-3'.

Peptide synthesis and hETBR-binding epitope mapping. Overlapping 12-mer peptides, frameshifted by one residue, covering the entire extracellular amino acid sequence of the ETBR receptor, were synthesized on a cellulose membrane using the SPOT technique.⁵⁷ Rendomab-B1 epitope mapping was performed according to a protocol described previously.²⁹ Briefly, the membrane was blocked overnight, washed three times in TBS containing 0.1% (v/v) Tween (TBST) and then incubated with TBST containing 5 µg/µL rendomab-B1 for 90 min at 37°C. After three washes with TBST (pH 7.0), the membrane was stirred in a solution of anti-mouse IgG labeled with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) for 1 h, washed three times again and finally incubated with the alkaline phosphatase substrate until the signal revealing the interacting peptides was sufficient. ImageJ software was used to quantify the signal obtained for each

spot. Peptides were considered as antigenically relevant if they were part of a consecutive series of reactive spots, presenting at least one signal peak three times higher than the background.⁵⁷

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Dr. Marc Iglarz for kindly providing ETAR overexpressing CHO cells, Drs. Philippe Robin and Zahra Tanfin for providing rat ETBR containing plasmid, Dr. Denis Servent for advice on calcium influx assays, Patricia Lamourette, Karine Moreau and Marc Plaisance for their expert assistance with monoclonal antibody production, and Jean-Charles Robillard for animal experiments. We acknowledge David Marsh for correcting the manuscript. This work was supported by bio-Mérieux and institutional funds from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA, France) and from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA 3515, Université Paris Diderot-Paris 7 and Ecole Doctorale ED 425, Université Paris Sud 11).

References

- Hayashi MA, Ligny-Lemaire C, Wollberg Z, Wery M, Galat A, Ogawa T, et al. Long-sarafotoxins: characterization of a new family of endothelin-like peptides. *Peptides* 2004; 25:1243-51; PMID:15350691; <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.05.010>.
- Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46:325-415; PMID:7831383.
- Thorin E, Clozel M. The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv Pharmacol* 2010; 60:1-26; PMID:21081213; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385061-4.00001-5>.
- Khimji AK, Rockey DC. Endothelin—biology and disease. *Cell Signal* 2010; 22:1615-25; PMID:20466059; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.002>.
- Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 111:508-31; PMID:16457892; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.11.001>.
- Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344:852-4; PMID:7916401; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92827-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92827-4).
- Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:235-55; PMID:7598493; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.001315>.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994; 79:1277-85; PMID:8001160; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90018-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90018-3).
- Meidan R, Levy N. The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:379-85; PMID:17997104; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2007.09.002>.
- Griswold DE, Douglas SA, Martin LD, Davis TG, Davis L, Ao Z, et al. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. *Mol Pharmacol* 1999; 56:807-12; PMID:10496965.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Wacławski M, Cannon RO 3rd, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33:753-8; PMID:10024340; <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.33.2.753>.
- Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157:1703-11; PMID:11073829; [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64807-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64807-9).
- Spinella F, Caprara V, Garrafa E, Di Castro V, Rosanò L, Natali PG, et al. Endothelin axis induces metalloproteinase activation and invasiveness in human lymphatic endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88:782-7; PMID:20725135; <http://dx.doi.org/10.1139/Y10-050>.
- Binder C, Hagemann T, Sperling S, Schulz M, Pukrop T, Grimshaw MJ, et al. Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2452-60; PMID:19671740; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0032>.
- Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, et al. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* 2008; 14:28-36; PMID:18157142; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1699>.
- Kandalafi LE, Motz GT, Duraiswamy J, Coukos G. Tumor immune surveillance and ovarian cancer: lessons on immune mediated tumor rejection or tolerance. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30:141-51; PMID:21298574; <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-011-9289-9>.
- Bagnato A, Catt KJ. Endothelins as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:378-83; PMID:18406309; [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00094-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00094-0).
- Demunter A, De Wolf-Peters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 2001; 438:485-91; PMID:11407477; <http://dx.doi.org/10.1007/s004280000362>.
- Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:11496-500; PMID:10500205; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.20.11496>.
- Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM. Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer* 2005; 104:1049-57; PMID:16007684; <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.21277>.
- Bagnato A, Natali PG. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* 2004; 2:16; PMID:15165288; <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-2-16>.
- Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *Mabs* 2010; 2:594-606; PMID:20864805; <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.2.6.13420>.
- Kozar N, Kelly MP, Orchard S, Burgess AW, Scott AM, Clayton AH. Differential and synergistic effects of epidermal growth factor receptor antibodies on unliganded ErbB dimers and oligomers. *Biochem* 2011; 10:3581-90.
- Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:343-57; PMID:16622479; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1837>.
- Iannello A, Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24:487-99; PMID:16408158; <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-005-6192-2>.
- Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1073-8; PMID:16151394; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0905-1073>.
- Costagliola S, Rodien P, Many M-C, Ludgate M, Vassart G. Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* 1998; 160:1458-65; PMID:9570567.

28. Kaptein SJF, Jungscheleger-Russell J, Martínez-Martínez P, Beiser PS, Lavreysen H, Vanheel A, et al. Generation of polyclonal antibodies directed against G protein-coupled receptors using electroporation-aided DNA immunization. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008; 58:27-31; PMID:18261934; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2007.11.002>.
29. Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuysen A, et al. Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biol* 2011; 30:727-37; PMID:21688998; <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2011.1239>.
30. Pedram A, Razandi M, Hu R-M, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 1997; 272:17097-103; PMID:93692027; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.27.17097>.
31. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 1997; 30:1198-203; PMID:9369276; <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.30.5.1198>.
32. Pierce KL, Premont RE, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:639-50; PMID:12209124; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm908>.
33. Schlyer S, Horuk R. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov Today* 2006; 11:481-93; PMID:16713899; <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2006.04.008>.
34. Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:339-57; PMID:18382464; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2518>.
35. Fujimoto A, Takatsuka S, Ishida I, Chiba J. Production of human antibodies to native cytokine receptors using the genetic immunization of KM mice. *Hum Antibodies* 2009; 18:75-80; PMID:19729802.
36. Takatsuka S, Skiguchi A, Tokunaga M, Fujimoto A, Chiba J. Generation of a panel of monoclonal antibodies against atypical chemokine receptor CCX-CKR by DNA immunization. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011; 63:250-7; PMID:21184834; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2010.12.003>.
37. Tymciuk S, Wijkhuysen A, Sagot M-A, Frobert Y, Grassi J, Crémion C, et al. Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P. *J Neuroimmunol* 2002; 128:23-30; PMID:12098507; [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00115-7).
38. Spinella F, Caprara V, Di Castro V, Rosanò L, Cianfrocca R, Natali PG, et al. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)* 2012; Epub ahead of print; PMID:22965194; <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-012-0956-2>.
39. Erdmann D, Allard B, Bohn J, De Pover A, Floersheimer A, Fontana P, et al. Kinetic Study of Human Full-Length Wild-Type JAK2 and V617F Mutant Proteins. *TOEIJ* 2009; 1:80-4; <http://dx.doi.org/10.2174/1874940200801010080>.
40. Ruf P, Gires O, Jäger M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* 2007; 97:315-21; PMID:17622246; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603881>.
41. Däumer MP, Schneider B, Giesen DM, Aziz S, Kaiser R, Kupfer B, et al. Characterisation of the epitope for a herpes simplex virus glycoprotein B-specific monoclonal antibody with high protective capacity. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200:85-97; PMID:20931340; <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-010-0174-x>.
42. Aubin J, Létourneau M, Francoeur E, Burgeon E, Fournier A. Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes. *Biochimie* 2008; 90:918-29; PMID:18343229; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.015>.
43. Lättig J, Oksche A, Beyersmann M, Rosenthal W, Krause G. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J Pept Sci* 2009; 15:479-91; PMID:19466696; <http://dx.doi.org/10.1002/psc.1146>.
44. Kondoh M, Miyazaki H, Watanabe H, Shibata T, Yanagisawa M, Masaki T, et al. Isolation of anti-endothelin receptor monoclonal antibodies for use in receptor characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172:503-10; PMID:2173568; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)90701-N](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(90)90701-N).
45. Yamaguchi T, Arimoto-Tahara I, Fujiyoshi Y, Doi T. Characterization and application of monoclonal antibodies against human endothelin B receptor expressed in insect cells. *Biotechnol Lett* 2004; 26:293-9; PMID:15055764; <http://dx.doi.org/10.1023/B:BILE.0000015428.68786.39>.
46. Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, et al. An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17:965-75; PMID:21245091; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2340>.
47. Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzuki A, Hori S, et al. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50:3257-61; PMID:2185884.
48. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, Catt KJ. Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1059-66; PMID:9816080.
49. Akiyama N, Hiraoka O, Fujii Y, Terashima H, Satoh M, Wada K, et al. Biotin derivatives of endothelin: utilization for affinity purification of endothelin receptor. *Protein Expr Purif* 1992; 3:427-33; PMID:1458057; [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-5928\(05\)80046-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-5928(05)80046-4).
50. Grantcharova E, Finkert J, Reusch HP, Krell H-W, Papsdorf G, Beyersmann M, et al. The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem* 2002; 277:43933-41; PMID:12226103; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M208407200>.
51. Grantcharova E, Reusch HP, Grossmann S, Eichhorst J, Krell H-W, Beyersmann M, et al. N-terminal proteolysis of the endothelin B receptor abolishes its ability to induce EGF receptor transactivation and contractile protein expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1288-96; PMID:16601236; <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000220377.51354.30>.
52. Girciz O, Lauer JL, Fields GB. Variability in melanoma metalloproteinase expression profiling. *J Biomol Tech* 2010; 21:194-204; PMID:21119930.
53. Tsutsumi M, Liang G, Jones PA. Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 1999; 228:43-9; PMID:10072757; [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00014-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00014-1).
54. Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10:903-10; PMID:11309363; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.9.903>.
55. Evans NJ, Walker JW. Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophys J* 2008; 95:483-92; PMID:18424490; <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.119206>.
56. Grassi J, Frobert Y, Lamourette P, Lagoutte B. Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase: application to the peripheral proteins of photosystem 1. *Anal Biochem* 1988; 168:436-50; PMID:3284414; [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90341-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(88)90341-7).
57. Laune D, Molina F, Ferrières G, Villard S, Bès C, Rieunier F, et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* 2002; 267:53-70; PMID:12135800; [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00140-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00140-0).

Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des endothélines, ET_AR et ET_BR, surexprimés dans de nombreux cancers et impliqués dans la progression tumorale.

Il est admis que l'axe endothéline (endothélines ET-1, -2 et -3 et leurs RCPG ET_AR et ET_BR), participe à la progression tumorale. Alors qu'ET_AR est par exemple surexprimé dans le cancer de l'ovaire, ET_BR l'est dans le mélanome. Cette surexpression, ainsi que l'implication d'ET_{A/B}R dans la carcinogenèse, font de ces RCPG une cible tumorale pertinente. En raison de leurs forte spécificité, actions cytotoxiques variées, possibilités de couplage, les anticorps monoclonaux (AcM) sont des outils de choix en diagnostic et thérapie anti-cancéreuse. Cependant, on déplore actuellement l'absence d'AcM ciblant des RCPGs sur le marché. Par une technique d'immunisation génique, 4 AcM anti-ET_AR et 24 anti-ET_BR ont été produits. Les résultats préliminaires obtenus avec les anti-ET_AR sont prometteurs puisque ces AcM lient avec une haute affinité ET_AR surexprimé dans des cellules CHO, l'un d'eux inhibant fortement la liaison du ligand. Mon travail de thèse s'est cependant concentré sur la caractérisation d'un anti-ET_BR, le rendomab-B4. Il reconnaît de façon spécifique et avec une forte affinité la conformation native d'ET_BR surexprimé à la surface de cellules de mélanomes, suggérant l'existence d'une forme tumorale du récepteur. Suite à sa liaison aux cellules UACC-257 (lignée de mélanome), l'AcM se trouve internalisé. Dans ces cellules, le rendomab-B4, malgré son incapacité à inhiber la liaison de l'ET, inhibe l'activation de la voie PLC induite par le ligand et est également un fort inhibiteur de la migration due à l'activation de l'axe endothéline. Ces travaux soulignent l'intérêt du rendomab-B4 comme outil diagnostique et thérapeutique dans le cas du mélanome.

Mots clés : axe endothéline, RCPG, cancer, anticorps monoclonaux

Laboratoire de rattachement :
CEA de Saclay, DSV/iBiTec-S/SPI
91191 GIF SUR YVETTE cedex

Ecole doctorale 425 : Innovation thérapeutique
Pôle : Immunologie et biothérapies
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex